

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Kateřina Řeháková

ÚLOHA MITOCHONDRIÍ V PATOGENEZI HUNTINGTONOVY
NEMOCI

THE ROLE OF MITOCHONDRIA IN THE PATHOGENESIS OF
HUNTINGTON'S DISEASE

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.
a prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

bakalářský studijní program Biochemie

pracoviště: Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch, KDDL 1. LF UK a VFN

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne.....

Podpis.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za ochotu, trpělivost a rady při odborném vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Spáčilové za pomoc a ochotu a své rodině za podporu a oporu.

Práce byla podpořena grantovými projekty:

COST LD15099 (MŠMT), z Norského finančního mechanismu na období 2009-2014 a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT) na základě smluvního projektu č. 28477/2014 - projektem "HUNTINGTON" 7F14308 a Progres Q26.

Abstrakt

Huntingtonova nemoc (HD) je neurodegenerativní onemocnění postihující nervový systém. Je způsobená mutací genu kódující protein huntingtin. Mutace se projevuje znásobením tripletů CAG.

Huntingtin je přítomný především v cytoplazmě. Interaguje s mnoha proteiny a role svou roli také při transkripci a buněčném transportu. Dále se také účastní správné regulace embryonálního vývoje a vývoje nervové tkáně. Je známo, že mutovaný huntingtin způsobuje vznik oxidačního stresu, poruchy biogeneze mitochondrií a poruchy OXPHOS.

Diagnostika Huntingtonovy nemoci je založena na laboratorním vyšetření přítomnosti alely predisponující ke vzniku nemoci. Klinický obraz je také důležitou součástí diagnostiky. Pacient vykazuje neovladatelné choreatické pohyby těla a různě rozsáhlé demence.

Cílem bakalářské práce bylo v teoretické části popsat hlavní charakteristiky Huntingtonovy nemoci se zaměřením dopadu HD na mitochondriální energetický metabolismus. V praktické části bylo cílem analyzovat respiraci mitochondrií pomocí vysoce citlivé polarografie v souboru 3 linií fibroblastů od pacientů s HD. Polarografická analýza ukázala, že respirace fibroblastů od pacientů s HD byla snížena ve srovnání s kontrolními liniemi. V naší studii se HD nejvíce projevila poškozením komplexu II oxidační fosforylace.

Klíčová slova: Huntingtonova nemoc, huntingtin, glutamin, OXPHOS

Abstract

Huntington's disease is a neurodegenerative disease affecting the nervous system. It is caused by the mutation of the huntingtin protein coding gene. The mutation is manifested by the multiplication of CAG triplets.

Huntingtin is present more in the cytoplasm. It interacts with many proteins and has roles also in transcription and cell transport. Huntingtin also participates in correct regulation of embryonic development and development of nerve tissue. Mutant huntingtin causes oxidative stress, mitochondrial biogenesis and OXPHOS disorders.

Diagnosis of Huntington's disease is based on a laboratory examination of the presence of an allele predisposing to the disease. Clinical imaging is also an important part of diagnostics. The patient exhibits uncontrollable choreatic body movements and dementia.

The aim of the thesis was to describe the main characteristics of Huntington's disease with the focus of HD on mitochondrial energy metabolism. In the practical part, the aim was to analyze mitochondrial respiration by high resolution polarography in a set of 3 fibroblast lines from patients with Huntington's disease. Polarographic analyses showed that respiration of HD fibroblasts was decreased in comparison with controls. We found that complex II of oxidative phosphorylation was most affected in HD lines.

Key words: Huntington's disease, huntingtin, glutamine, OXPHOS

Obsah

1	Teoretický úvod	10
1.1	Mitochondrie	10
1.1.1	Úvod	10
1.1.2	Stavba	10
1.1.3	Mitochondriální DNA	11
1.1.4	Oxidační fosforylace	12
1.2	Huntingtonova choroba	16
1.2.1	Úvod	16
1.2.2	Historie	16
1.2.3	Autosomálně dominantní onemocnění	16
1.2.4	Genetický obraz	16
1.2.5	Příznaky Huntingtonovy nemoci	17
1.2.6	Diagnostika Huntingtonovy choroby	18
1.2.7	Huntingtin	19
1.2.8	Patologický huntingtin	19
1.3	Mitochondrie a Huntingtonova choroba	20
1.3.1	Nejdůležitější cíle působení mutovaného huntingtinu	20
1.3.2	Mitochondriální onemocnění	23
1.3.3	Mitochondriální respirometrie	24
2	Cíl práce	27
3	Materiál a metody	28
3.1	Materiál	28
3.1.1	Kontrolní linie	28
3.2	Použité chemikálie	29
3.3	Použité přístroje	31
3.4	Metody	33
3.4.1	Skladování a rozmrazování buněk	33
3.4.2	Sklízení a zamrazování fibroblastů	33
3.4.3	Kultivace fibroblastů	33
3.4.4	Sklízení fibroblastů pro účely respirometrie	34
3.4.5	Respirometrie	34
3.4.6	Analýza výsledné křivky spotřeby kyslíku	36
3.4.7	Stanovení proteinů podle Lowryho	38

4	Výsledky	39
4.1	Kontrola růstu fibroblastů	39
4.2	Stanovení koncentrace podle Lowryho	41
4.3	Výsledky měření s glutamátem	41
4.3.1	Respirační stavy	42
4.3.2	Poměry respiračních stavů	43
4.4	Výsledky měření s pyruvátem	44
4.4.1	Respirační stavy	44
4.4.2	Poměry respiračních stavů	46
5	Diskuze	47
6	Závěr	49
7	Citovaná literatura	50

Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
AmA	antimycin A
Asc	askorbát
ATB	antibiotický a antimykotický roztok
bp	pár bází
BSA	hovězí sérový albumin
CAG	cytosin, adenin, guanin (kodon pro glutamin)
CT	počítačová tomografie
cyt	cytochrom
Da	Dalton
Dig	digitonin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová aminokyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
F ₁	podjednotka komplexu V
FBS	fetální hovězí sérum
FCCP	karbonylkyanid-p-trifluoro-methoxyfenylhydrazon
FAD, FADH ₂	flavinadenindinukleotid
Fe-S	železosírné centrum
FMN	flavinmononukleotid
F ₀	funkční doména komplexu V
Glu, G	glutamát
H ⁺	vodíkový kationt
HD	Huntingtonova choroba
Htt	huntingtin
iFBS	inaktivované fetální hovězí sérum
K 1-3	kontrola
KI	komplex I

KII	komplex II
KIII	komplex III
KIV	komplex IV
KV	komplex V
Mal, M	malát
mHtt	mutovaný huntingtin
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová aminokyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
OCR	rychlost spotřeby kyslíku
OXPHOS	oxidativní fosforylace
P	pacient
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfáty
PCR	polymerázová řetězová reakce
P _i	anorganický fosfát
PIC	koktejl inhibitorů proteáz
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
POS	polarografický kyslíkový senzor
PVDF	polyvinylidenfluorid
Q	koenzym Q
QH ₂	redukovaný koenzym Q
RIPA	z anglického „radio immunoprecipitation assay“
RNA	ribonukleová aminokyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
Rot	rotenon
rRNA	ribozomální ribonukleová aminokyselina
Suk, Su	sukcinát
T+E	roztok trypsinu a EDTA
TMPD	tetramethyl-p-phenylendiamin dihydrochlorid
tRNA	transferová ribonukleová aminokyselina

1 Teoretický úvod

1.1 Mitochondrie

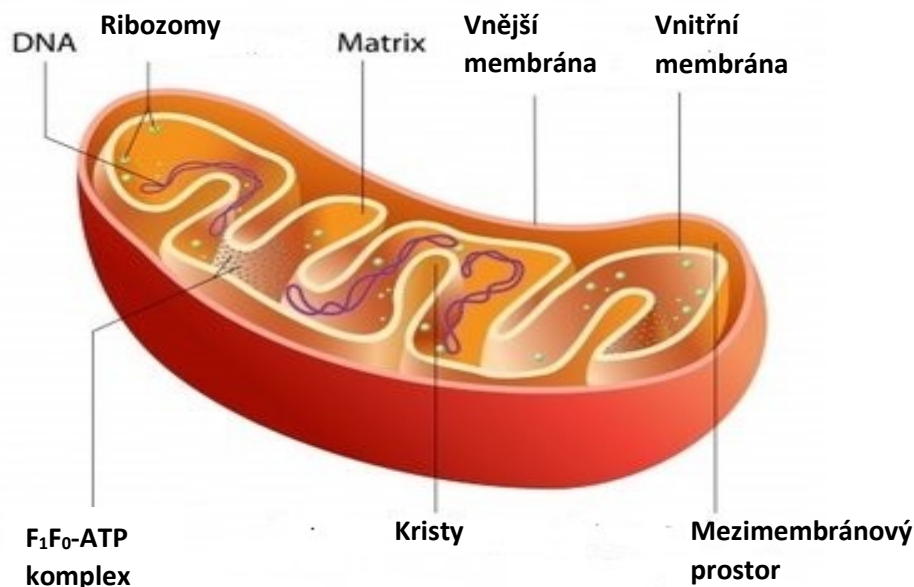
1.1.1 Úvod

Mitochondrie jsou semi-autonomní dynamické organely endosymbiotického původu s důležitou rolí v organismu. Podílí se na přeměně energie a syntéze klíčových prekurzorů metabolitů, redukčních ekvivalentů a kofaktorů. Více než padesát let jsou mitochondrie označovány “buněčnou elektrárnou“. Toto vědecké označení vychází z jejich hlavní bioenergetické funkce – produkce ATP (z anglického adenosine triphosphate, česky adenosintrifosfát) (1). Tento proces začíná transportem substrátů z cytosolu a následuje jejich katabolická přeměna pomocí oxidace mastných kyselin a citrátového cyklu, kterými získáme redukční ekvivalenty NADH (z anglického nicotinamide adenine dinucleotide, česky nikotinamidadenindinukleotid) a FADH_2 (z anglického flavo adenine dinucleotide, česky flavinadenindinukleotid) a další biosyntetické prekurzory. Redukční ekvivalenty produkované citrátovým cyklem jsou hnací silou elektronového transportního řetězce, který je součástí mitochondriální oxidační fosforylace (OXPHOS), z které se získá ATP (2).

1.1.2 Stavba

Mitochondrie jsou tvořeny vnitřní a vnější membránou, které mají strukturu fosfolipidové dvojvrstvy a obsahují také proteiny. Tyto membrány se liší svými vlastnostmi a rozdělují mitochondrii na několik částí. Celou mitochondrii obaluje vnější membrána, za ní následuje mezimembránový prostor a vnitřní membrána. Tato membrána nemá typický rovný povrch, ale je zvlněná do matrix (vnitřní prostor ohraničený vnitřní membránou) a tvoří tak krysty. Vnější membrána ohraničuje celý prostor a odděluje tak vnitřní prostředí buňky od okolního cytosolu (Obr. 1. str. 11). Stavbou se podobá membráně endoplazmatického retikula. Na povrchu obsahuje mnoho pórů (mitochondriální poriny) propustných pro mnoho látek s molekulovou hmotností do 5000 Da. Kvůli této hraniční hodnotě velikosti neprojdou proteiny a jiné makromolekuly (3). Neprojdou póry, ale mají vlastní způsob transportu – TOM komplex (z anglického translocase of the outer membrane, česky translokáza vnější membrány). Dále na vnější membráně nalezneme enzymy potřebné k metabolismu mastných kyselin a fosfolipidů. Vnitřní membrána je

zvlněná do krist, které výrazně zvyšují její povrch. Velikost krist závisí na metabolické aktivitě dané buňky. Je velmi důležitá, protože je na ni lokalizováno mnoho klíčových enzymů dýchacího řetězce. Její speciální fosfolipidová dvojvrstva obsahuje neobvyklý fosfolipid kardiolipin, z jehož fosfátové hlavy vychází čtyři mastné kyseliny (4). Matrix je koloidní roztok obsahující bílkoviny, enzymy Krebsova cyklu, anorganické ionty, nukleotidové koenzymy, ribozomy, RNA a mitochondriální DNA.



Obr. 1. Stavba mitochondrie. Na obrázku je znázorněna stavba mitochondrie. Mitochondrie je ohraničena vnější mitochondriální membránou. Ta je od vnitřní membrány oddělena mezimembránovým prostorem. Vnitřní membrána tvoří kristy a na povrchu krist je umístěn F_1F_0 -ATP komplex. Kristy ohraničují prostor zvaný matrix a zde se nachází ribozomy a mitochondriální DNA (převzato a upraveno podle www.biology.tutorvista.com).

1.1.3 Mitochondriální DNA

Každá mitochondrie má vlastní DNA. Tato mtDNA je cirkulární a dvouřetězová. V každé buňce mají mitochondrie více kopií tohoto genomu. Mitochondriální chromosom u člověka obsahuje 37 genů (16 569 bp) a 13 z nich kódují podjednotky proteinů dýchacího řetězce (4). Lidská mitochondriální DNA obsahuje geny ND1 až ND6 kódující proteiny komplexu I (NADH: ubichinon-oxidoreduktázy). Dále gen Cyt b kódující cytochrom b komplexu III (ubichinol:cytochrom c oxidoreduktázy), geny COI až COIII kódující podjednotky komplexu IV (cytochrom c oxidázy) a dva geny ATPase6 a ATPase8 pro dvě podjednotky komplexu V (ATP syntázy). Zbytek genů kóduje rRNA a specifické mitochondriální

tRNA, které jsou potřebné v syntéze proteinů. Specifita mitochondriální tRNA spočívá v odlišnosti kodonů pro aminokyseliny. Mnoho proteinů, okolo 1 100 různých typů, je kódována v jaderných genech (5).

1.1.4 Oxidační fosforylace

Oxidační fosforylace je lokalizována na vnitřní mitochondriální membráně. Je hlavním procesem získání energie. Začíná vstupem elektronů do dýchacího řetězce. Většina těchto elektronů pochází z aktivity dehydrogenáz, které je získávají z katabolických procesů a předávají je na universální akceptor NAD^+ nebo NADP^+ anebo na FMN nebo FAD. Konečným akceptorem elektronů je kyslík (6). Systém oxidační fosforylace se skládá ze čtyř komplexů dýchacího řetězce, dvou elektronových přenašečů (koenzym Q a cytochrom c) a ATP syntázy, která je označována také jako komplex V (Obr. 2. str. 15).

1.1.4.1 *Komplex I*

Komplex I (KI) je NADH: ubichinon-oxidoreduktáza. Je to velký komplex, který obsahuje více než 46 různých polypeptidových řetězců. Má tvar písmene L s jedním koncem zanořeným v membráně a druhým volně vyčnívajícím do matrix (7). KI katalyzuje dva procesy. Prvním je exergonický přenos H^+ iontu z NADH a přenos protonu z matrix na ubichinon. Druhým endergonický přenos čtyř protonů z matrix do mezimembránového prostoru. KI je tedy protonovou pumpou poháněnou přenosem elektronů. Tento přenos je vektorový: protony se pohybují z jednoho místa (matrix), kde jsou negativně nabitý a vznikají z nich protony, do místa druhého (mezimembránový prostor), kam přicházejí kladně nabitý (8). Tento tok elektronů z KI na ubichinon, a tedy i celá oxidační fosforylace, je inhibován různými látkami, jako jsou například amytal, rotenon, piericidin A a další. KI zajišťuje přenos H^+ iontu z NADH na FMN, odtud jdou dva elektrony přes Fe-S centra až na protein N-2 v matrix. Dále elektrony v podobě QH_2 difundují do lipidové dvojvrstvy, z matrix se tak dostanou čtyři protony za každý pár elektronů. Tento tok protonů vytváří elektrochemický potenciál přes vnitřní mitochondriální membránu a tím pohání ATP syntázu (9).

1.1.4.2 *Komplex II*

Komplex II (KII), nazýván sukcinát: ubichinon-oxidoreduktáza, je menší a jednodušší než KI, přesto obsahuje čtyři různé proteinové podjednotky a dva druhy pěti prostetických

skupin. Dvě z nich jsou integrální membránové proteiny a každý obsahuje tři transmembránové helixy. Obsahuje hemovou skupinu a vazné místo pro ubichinon, který je konečným akceptorem elektronů v KII. Další dvě podjednotky vyčnívají do matrix a obsahují tři 2Fe-2S centra, vázané FAD a vazebné místo pro sukcinát (10). Jiné substráty pro mitochondriální dehydrogenázy získávají elektrony jinou cestou než přes KII, a to beta oxidací mastných kyselin. Prvním krokem beta oxidace mastných kyselin, katalyzované acetyl-CoA dehydrogenázou, je přenos elektronu ze substrátu na FAD, poté na ETF (z anglického electron-transferring flavoprotein, česky flavoprotein přenášející elektron) a dále přecházejí na ETF: ubichinon oxidoreduktázu. Ta přenesení elektronu redukcí ubichinonu do dýchacího řetězce. Glycerol-3-fosfát je oxidován glycerol-3-fosfát dehydrogenázou, která je lokalizována na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány a podobně jako předchozí enzymy, pomocí redukce ubichinonu, transportuje elektrony do dýchacího řetězce (11).

1.1.4.3 Komplex III

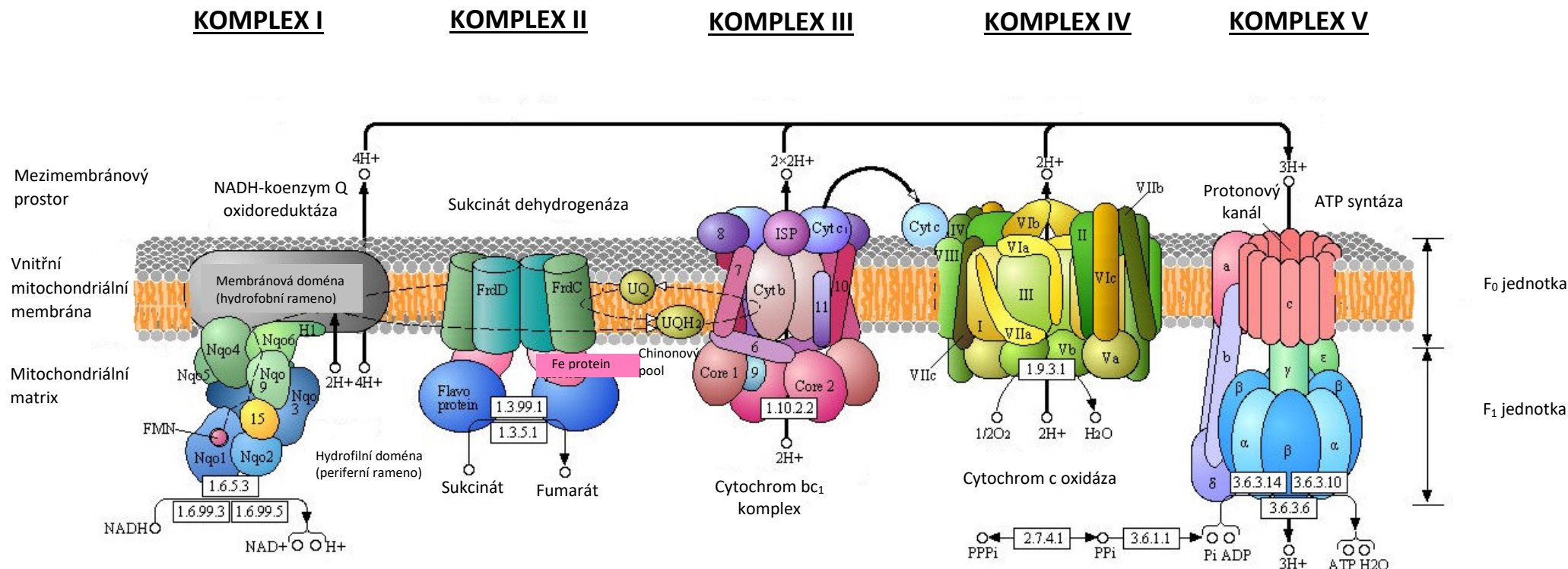
Dalším komplexem je KIII nazývaný též cytochrom bc_1 komplex nebo ubichinol: cytochrom c-oxidoreduktáza. Komplex III je dimerem dvou stejných monomerů, každý obsahuje 11 různých podjednotek. Funkční centrum každého monomeru je tvořeno třemi podjednotkami: cytochrom b s dvěma hemy, Rieskeho FeS protein s 2Fe-2S centrem a cytochrom c_1 s hemem. V mezimembránovém prostoru se nachází cytochrom c, který může interagovat s Rieskeho FeS proteinem a s cytochromem c_1 (12). KIII má dvě různá vazebná místa pro ubichinon, která jsou shodná pro inhibitory dvou léků blokující oxidační fosforylaci. Jedním z těchto léků je antimycin A, který blokuje tok elektronů z cytochromu b na ubichinon. Myxothiazol zabraňuje elektronům pohybu od ubichinolu na Rieskeho Fe-S protein. Nezbytností pro funkci komplexu III je dimerní struktura. Mezi dvěma monomery jsou dvě dutiny a ty obsahují Q_P vazebné místo od jednoho monomeru a vazebné místo Q_N od druhého. Meziprodukty ubichinonu se pohybují přes tyto dutiny a jsou tak chráněny (13). Komplex III krystalizuje ve dvou odlišných konformacích. V jedné z nich je Rieskeho Fe-S centrum blízko k hemu cytochromu c_1 (jeho elektronový akceptor), ale vzdáleno od místa, kde přijímá elektrony (cytochrom b a vazebné místo na ubichinolu). V druhé konformaci se Rieskeho protein oddálil od cytochromu c_1 směrem k cytochromu b. Jeho skutečná konformace se pohybuje někde mezi těmito konformacemi, protože jednou je tento protein redukovaný a jindy oxidovaný (14).

1.1.4.4 Komplex IV

Komplex IV (cytochrom c oxidáza) je dimer, jehož každý identický monomer má čtyři podjednotky. Celkem je KIV složen z 13 podjednotek. Podjednotka I obsahuje hemy a a a_3 , blízko iontu mědi Cu_B . Hem a_3 a Cu_B spolu tvoří dvoujaderné centrum Fe-Cu. Podjednotka II obsahuje dva ionty mědi, které jsou spojeny SH skupinou dvou cysteinových zbytků a tvoří tak dvoujaderné centrum Cu_A podobné $2Fe-2S$ centrům FeS proteinů (15). Toto centrum a vazebné místo cytochromu c jsou umístěny na doméně podjednotky II, která vyčnívá do mezimembránového prostoru. Podjednotka III zajišťuje rychlý pohyb protonů přes podjednotku II. Funkce podjednotky IV je zatím neznámý (16). Pohyb elektronů přes komplex IV začíná u cytochromu c, dvě molekuly redukováného cytochromu c předají dva elektrony na Cu_A centrum, odtud přes hem až na Fe-Cu centrum. Kyslík je navázán na hem a_3 a redukován dvěma elektrony z Fe-Cu centra na O_2^{2-} . Další dva elektrony z cytochromu c (celkem tedy čtyři) přemění se spotřebou čtyř protonů z matrix O_2^{2-} na dvě molekuly vody. Zároveň jsou čtyři protony transportovány z matrix do komplexu (17).

1.1.4.5 ATP syntáza

ATP syntáza, nazývaná také komplex V, je složen ze dvou částí: protonový kanál (F_0), který prochází membránou a katalytická jednotka (F_1), která vystupuje do matrix. Protonový kanál obsahuje 12 peptidů c a jednu podjednotku a. Katalytická jednotka je tvořena třemi α a β podjednotkami a s třemi aktivními centry a celá je spojena s membránou pomocí b_2 a δ polypeptidy. F_0 a F_1 jsou spojeny otočným systémem s γ a ϵ podjednotkou. Celý pohyb má tři fáze: navázání ADP a P_i , tvorba anhydridové vazby a uvolnění produktu. Nejprve je energie získaná z transportu protonů využita k rotaci γ podjednotky, tím se změní konformace α a β a pohání tak tvorbu ATP (18). Celkem tvoří KV 14 podjednotek.



Obr. 2. Schématické znázornění komplexů OXPHOS. Na obrázku je znázorněna struktura komplexů systému OXPHOS (NADH-koenzym Q oxidoreduktáza, sukcinát dehydrogenáza, ubiquinon: cytochrom c oxidoreduktáza, cytochrom c oxidáza, ATP syntáza). KI má tvar písmene L, jedním koncem je zanořen do membrány a druhý je volně v matrix. Komplex II je menší než KI a je tvořen pěti prostetickými skupinami a čtyřmi proteinovými podjednotkami, dvě jsou integrální membránové proteiny, další dvě volně vyčnívají do matrix. KIII je dimerem s 22 podjednotkami. KIV je opět dimerem s osmi podjednotkami. Ty jsou tvořeny hemy a obsahují Fe-Cu centrum. KV, tvořený jednotkami F₁ a F₀, vytváří ATP a kyslík, jako finální akceptor protonů, je zde přebírá. Černé šipky vyznačují směr putování protonů přes komplexy až na konečný kyslík. (převzato a upraveno podle www.kegg.org).

1.2 Huntingtonova choroba

1.2.1 Úvod

Huntingtonova choroba (HD, z anglického Huntington's disease) je neurodegenerativní dědičné onemocnění mozku charakteristické samovolnými trhavými pohyby těla a snížením mentálních schopností. Postihuje jedince obojího pohlaví s frekvencí 5-10 nemocných na 100 000 zdravých jedinců. Nemoc se začne projevovat mezi 20. až 40. rokem života. Objeví-li se dříve než po dvacátém roce života, označuje se jako juvenilní Huntingtonova choroba (19).

1.2.2 Historie

Objevitel této nemoci byl George Huntington. Narodil se do lékařské rodiny roku 1850. Studoval lékařství na Kolumbijské univerzitě a po jejím absolvování v roce 1871 začal praktikovat medicínu. Krátce na to se setkával častěji a častěji s lidmi trpící demencí již ve středním věku. Zbýval se jimi i jejich rodinou a zkoumal i pacienty svého otce a praoce vykazující stejné příznaky. Ve svých dvaceti letech, tedy roku 1870, svá pozorování obhajoval před členy lékařské akademie (20).

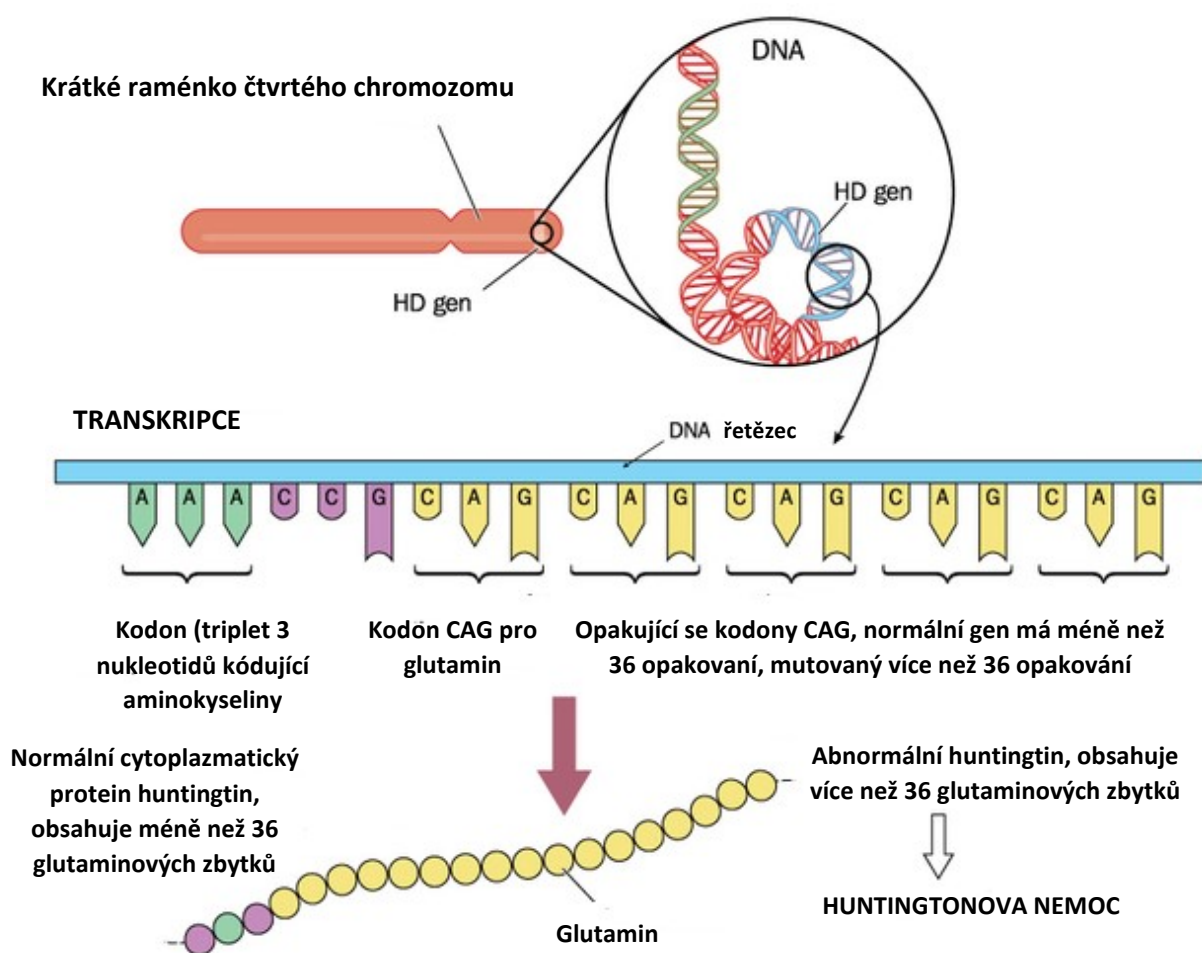
1.2.3 Autosomálně dominantní onemocnění

Huntingtonova nemoc je autosomálně dominantní onemocnění (21). Odpovědné jsou nepohlavní geny - autosomy. Přenos znaku je podmíněn dominantní alelou, jíž funkce převládá nad recesivní alelou. Fenotypově se daný gen projeví u jedinců, kteří jsou z pohledu genetiky heterozygoti (Aa) anebo dominantní homozygoti (AA). Fenotypově zdraví jedinci, tedy recesivní homozygoti (aa), nepřenášejí mutaci do další generace. Příkladem těchto onemocnění jsou mimo jiné také polydaktylie, familiární hypercholesterolemie a osteogenesis imperfecta (22).

1.2.4 Genetický obraz

Z genetického hlediska je nemoc způsobená mutací genu kódující protein huntingtin. Tento gen je lokalizován na krátkém raménku čtvrtého chromosomu (23) a je tvořen 3144 aminokyselinami. Mutace se nachází v prvním exonu tohoto genu a úsek CAG začíná od 18. aminokyseliny na NH₂ konci daného řetězce (24). Mutace se projevuje znásobením

tripletů CAG (tj. Cytosin-Adenin-Guanin), tedy kodonu pro glutamin (Obr. 3.). Normální počet repeticí je 10-28. Patologicky se projeví 36-120 opakování tripletů. Počet opakování ovlivňuje nástup nemoci, tedy dobu, kdy se začnou projevovat první symptomy. Čím více opakování, tím dříve se daná nemoc projeví (25). Při přenosu genetické informace na další generace se zvyšuje počet mutovaných alel a tím se zvyšuje i závažnost nemoci u potomků (26).



Obr. 3. Zmnožení CAG tripletů. Na obrázku je vyobrazen náčrt genu a DNA řetězce kódující huntingtin – protein, jehož mutace způsobuje Huntingtonovu nemoc. Na DNA řetězci je ukázána repetice CAG kodonů a dále výsledný řetězec glutaminu (převzato a upraveno podle www.healthlifemedia.com).

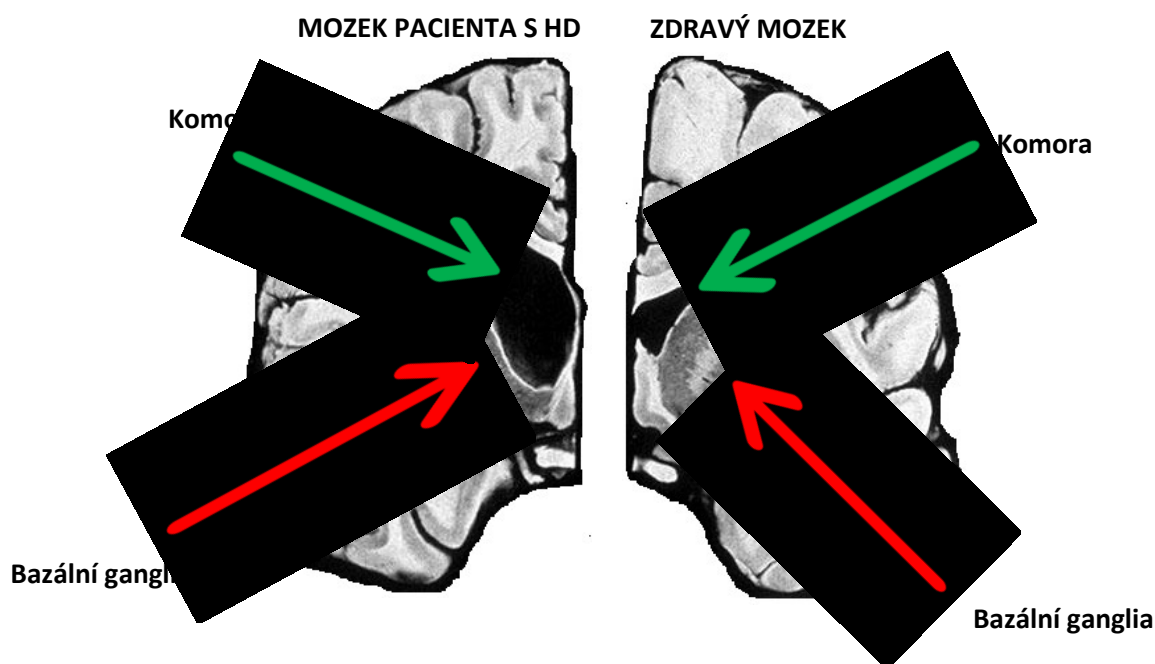
1.2.5 Příznaky Huntingtonovy nemoci

Obecně platí, že s postupným nástupem nemoci jsou příznaky závažnější. Mezi hybné příznaky Huntingtonovy nemoci patří chorea, tedy samovolné pohyby končetin, obličejových svalů a prstů. Chorea má tendenci se zhoršovat. Pacienti začínají s mírnými záškuby a končí výraznými škubavými pohyby. Dále dochází k poruchám jemné motoriky

(projevující se především u psaní), k zhoršení koordinace pohybů a k rychlým nekontrolovatelným trhavým pohybům očí. Další skupinou jsou kognitivní projevy. Mezi ně patří postižení krátkodobé paměti, pozornosti a potíže s komunikací. Neobvyklé úzkostné chování, agrese, podrážděnost a deprese jsou behaviorální projevy doprovázející Huntingtonovu nemoc.

1.2.6 Diagnostika Huntingtonovy choroby

Diagnózu lze potvrdit nebo vyvrátit na základě laboratorních vyšetření. Molekulárně genetické testování určí, jestli má daný jedinec alelu predisponující ke vzniku nemoci. Dále je využito k potvrzení klinické diagnózy a testování pacientů, u kterých se prozatím neobjevily příznaky, ale je u nich riziko, že danou alelu zdědili (27). Nejběžnějším postupem testování je přímá mutační analýza. Ta umožňuje analýzu DNA cílenou na počet CAG tripletů. Nejrozšířenější metody používané k testování jsou PCR (z anglického Polymerase Chain Reaction, česky Polymerázová řetězová reakce) a Southernův přenos (z anglického Southern blot) (28).



Obr. 4. MRI mozku pacienta s HD a zdravého mozku. Na snímku mozku pacienta s HD pozorujeme zvětšení mozkových komor a značnou atrofii mozkové tkáně a bazálních ganglií. (převzato a upraveno podle www.tpe-maladies-neurodegeneratives-du-cerveau.e-monsite.com).

Klinická vyšetření zahrnují rodinnou anamnézu a posouzení příznaků a projevů nemoci. Charakter se liší podle klinického obrazu a progresi onemocnění. Dále se testují kognitivní, behaviorální a motorické projevy, a to formou jednoduchých testů, které určí výskyt a závažnost těchto symptomů (29). MRI (z anglického Magnetic Resonance Imaging, česky magnetická rezonance) nebo CT (z anglického Computed Tomography, česky výpočetní tomografie) slouží k získání obrazu mozku a postižených oblastí (Obr. 4. str. 18). Léčba neexistuje. Existují však léky, které ovlivňují příznaky nemoci, např. nerovnováhu v hladinách neurotransmiterů (30).

1.2.7 Huntingtin

Jak bylo zmíněno výše (viz kapitola 1.2.4) Huntingtonova choroba je nemoc způsobená mutací genu kódující protein huntingtin. Gen kódující huntingtin má lokalizaci 4p16.3. Nachází se tedy na krátkém raménku chromosomu 4. Byl určen před téměř dvaceti lety, jeho normální funkce stále není zcela známá. Huntingtin je přítomný více v cytoplasmě než v jádře (31). Obsahuje řadu domén, pomocí kterých interaguje s mnoha proteiny, které se účastní při genové expresi, endocytóze, transportu váčků, vnitrobuněčné signalizaci a metabolismu (32, 33). Role při transkripci a vnitrobuněčném transportu je dobře známá (34, 35). V cytoplasmě interaguje s dyneinem a kinesinem, proteiny umožňující pohyb organel (včetně mitochondrií) podél mikrotubulu v buňkách, tedy i v neuronech (36). Může kyvadlově regulovat transkripci pomocí přenosu transkripčních faktorů mezi jádrem a cytoplasmou a dále interakcí s proteiny související s makromolekulárními komplexy, ve kterých dochází k sestřihu sekvence DNA (37). Studie na myších dokázaly, že huntingtin je zodpovědný za normální embryonální vývoj a vývoj nervové tkáně (38). Při pokusech na myších (R6/2) bylo pozorováno, že vyřazení genu pro huntingtin bylo pro myš v období počáteční embryogeneze letální (39). Jiný výzkum prokázal, že snížení hladiny huntingtinu u myši způsobilo abnormální rozdělení a morfologii organel, a to u endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a mitochondrií (40). V neposlední řadě hraje huntingtin roli také při dělení buněk tím, že působí na dynein a ovlivňuje tak orientaci dělicího vřeténka (41).

1.2.8 Patologický huntingtin

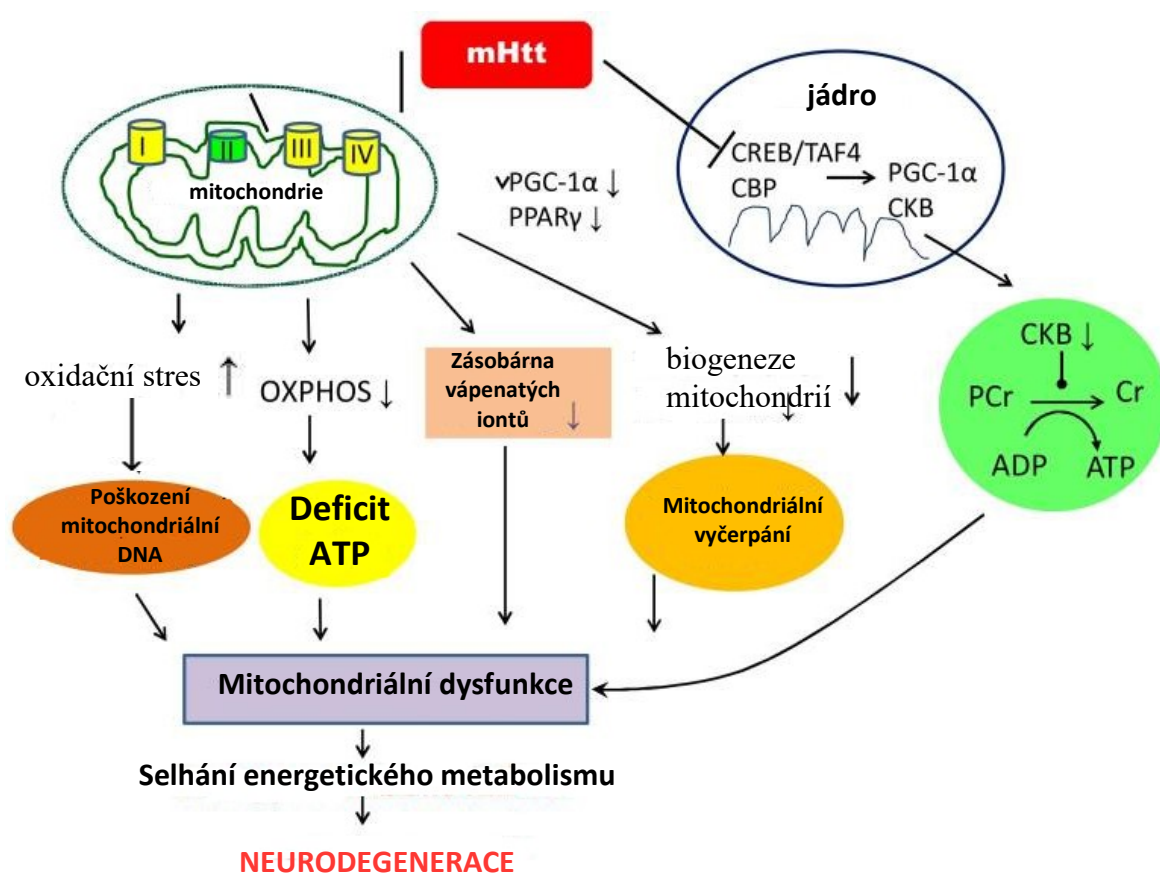
Mutovaný huntingtin vzniká prodloužením počtu glutaminů a toto prodloužení způsobuje problémy jako je tvorba agregátů a poruchy v odbourávání. U mitochondrií se budeme

soustředit na čtyři nejdůležitější cíle působení mutovaného huntingtinu (mHtt) (viz kapitola 1.3.1).

1.3 Mitochondrie a Huntingtonova choroba

1.3.1 Nejdůležitější cíle působení mutovaného huntingtinu

Mutovaný huntingtin (viz kapitola 1.2.8) ovlivňuje čtyři hlavní procesy probíhající v organismu a je příčinou poruch mitochondrií. Důsledkem působení mutovaného huntingtinu je vznik oxidačního stresu. Dále způsobuje narušení funkce mitochondrií jako zásobáren vápenatých iontů, poruchy biogeneze mitochondrií a poruchy OXPHOS (1.1.4). Všechny tyto poruchy vedou k mitochondriální dysfunkci, poté k selhání energetického metabolismu a nástupu procesu neurodegenerace (Obr. 5.).



Obr. 5. Schéma molekulárního mechanismu působení huntingtinu. Mutovaný huntingtin (mHtt) způsobuje narušení funkce mitochondrií jako zásobáren vápenatých iontů, poruchy biogeneze mitochondrií a poruchy OXPHOS, navíc důsledkem jeho působení vzniká oxidační stres (převzato a upraveno podle (38)).

1.3.1.1 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká kvůli zvýšení ROS (z anglického Reactive Oxygen Species, česky reaktivní formy kyslíku) v organismu jako je superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový aniont (OH^-) a reaktivní formy dusíku jako peroxynitrit ($ONOO^-$). ROS narušuje funkci buněk, protože degradují proteiny, lipidy i nukleové kyseliny. Co přesně je původce ROS v organismu není s jistotou identifikováno, ale má se za to, že hlavním zdrojem jsou mitochondrie, protože během dýchacího řetězce se uvolňuje velké množství superoxidu, a to zejména z komplexů I a III. Defekty dýchacího řetězce způsobí nárůst ROS a inhibice komplexu II vznik oxidačního stresu (42). Největší nebezpečí hrozí mitochondriální akonitáze. Je nejcitlivější na oxidační stres. Obsahuje shluk (z anglického cluster) železa a síry a ten je snadno inaktivován, ztrátou železa v jeho katalyticky aktivním místě, působením superoxidu (43). U pacientů s Huntingtonovou chorobou s nárůstem oxidačního stresu byl pozorován pokles aktivity akonitázy v *caudatu* (o 90%), menší pokles aktivity akonitázy v *putamen* (~70%) a ještě menší pokles v kůře (~50%) (47). Zvýšená koncentrace ROS, včetně většího množství lipofuscinu, je u mozku pacientů s Huntingtonovou chorobou pozorovatelná hlavně na neuronech *striata* (44). Dále se v mozku a v krvi pacientů s Huntingtonovou chorobou vyskytují i jiné známky přítomnosti ROS jako je hromadění 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (OH^8dG) nebo zlomy DNA (45), na mozku více produktů oxidační degradace proteinů a lipidů a výskyt mitochondriální a cytoplasmatické superoxid dismutázy a v krvi nárůst malondialdehydu (46). Oxidační stres podporuje hromadění mutovaného huntingtinu a zhoršuje funkci proteazomů, což vyvolává buněčnou smrt (47). Všechny tyto výsledky podporují teorii, že oxidační procesy zhoršují Huntingtonovu nemoc.

1.3.1.2 Mitochondrie jako zásobárny vápenatých iontů

Mitochondrie mají důležitou funkci jako zásobárny vápníku a pomáhají tak udržet stálé vnitřní prostředí v buňce (48). Transport vápníku u mitochondrií je poháněn protonovým gradientem a zvýšená hladina neurálního vápníku modifikuje tvorbu ATP v mitochondriích. Nadměrné množství vápníku v mitochondriích způsobuje otevření mitochondriálních pórů a tím uvolnění cytochromu c, a to má za následek buněčnou smrt (49). Při zkoumání vlivu koncentrace vápníku na depolarizaci mitochondrií u HD pacientů bylo pozorováno, že u postižených pacientů dochází ke snížení membránového potenciálu a depolarizaci při nižších koncentracích vápníku než u kontrolních mitochondrií (50).

V buňkách *striata* obsahující mutovaný huntingtin byla objevena snížená hladina ATP a pokles poměru ATP/ADP, což je spojeno s větším množstvím vápníku, který je transportován pomocí N-methyl-D-aspartát (NMDA) receptorů (51). Mitochondrie inkubované s mutovaným huntingtinem byly citlivější na vápník, který způsobuje otevírání mitochondriálních pórů a uvolnění cytochromu c (52), což jasně prokazuje přímý vliv mutovaného huntingtinu na ukládání vápníku. U buněk *striata* je tento vliv výraznější než u buněk kortikálních (53).

1.3.1.3 Poruchy biogeneze a bioenergetika mitochondrií

Mitochondriální biogenezi a energetickou homeostázu ovlivňují geny, jejichž expresi reguluje peroxizom proliferaci aktivující receptor γ co-aktivátor 1 α (PGC-1 α) (54). PGC-1 α interaguje s mnoha transkripčními faktory a ty ovlivňují expresi mitochondriálních genů, které kódují proteiny dýchacího řetězce (55). PGC-1 α hraje klíčovou roli v modulaci energetického metabolismu a jeho expresi výrazně potlačuje mutovaný huntingtin. V mozku a myoblastech pacientů byl pozorován pokles jeho cílových genů (56) a v játrech, hnědé tukové tkáni a svalech pokles PGC-1 α mRNA (57). U myši s HD byl vyřazen gen pro PGC-1 α a výsledkem byl nárůst degenerace striatálních buněk a motorické abnormality. Naopak exprese PGC-1 α částečně chránila proti toxickým účinkům mutovaného huntingtinu. Nefunkční PGC-1 α je tedy jedním z pozorovaných znaků u postižených pacientů (56).

Patologický huntingtin způsobuje snížení poměru ATP/ADP. Ve striatu myši (R6/2) byla pozorována nižší produkce energie, které předcházelo snížení mitochondriální aktivity enzymů vlivem zvýšené karbonylace těchto enzymů (58). U myši bylo pozorováno, že s věkem a s postupem onemocnění se zvyšuje přítomnost mutovaného huntingtinu v mozkových mitochondriích, a to vede ke snížení tvorby mitochondriální ATP (59). Mitochondrie mají určitou respirační rezervu. Je to zásoba, kterou buňka v daný moment nepotřebuje k udržení metabolismu. Také je důležitá pro homeostázu a přežití neuronů. Pokles této rezervy byl pozorován u lidských fibroblastech a v buňkách *striata* u myši (59). Dále v mozku pacientů s HD byla objevena snížená spotřeba glukózy, zejména v bazálních gangliích (60) a jiné studie objevily zvýšenou koncentraci laktátu v bazálních gangliích a v okcipitální kůře, v mozkomíšním moku byl pozorován zvýšený poměr laktátu ku pyruvátu (61). Tato pozorování potvrzují negativní vliv mutovaného huntingtinu na bioenergetiku mitochondrií, ale přesný mechanismus není znám.

1.3.1.4 Poruchy OXPHOS

Inhibicí sukcinát dehydrogenázy 3-nitropropionátem nebo malonátem byly pozorovány klinické obrazy a neuropatologie odpovídající Huntingtonově nemoci (62). Z toho vyplývá, že poruchy komplexu II jsou klíčové a často zkoumané projevy Huntingtonovy nemoci. Studiemi *caudata* a *putamen* u pacientů vykazující symptomy HD bylo prokázáno výrazné snížení aktivity komplexu II a III a v menší míře také komplexu IV. Ve frontální kůře a mozečku nebyly pozorovány výraznější změny v činnosti komplexů dýchacího řetězce (63). Benchoua objevil snížení obsahu FAD a Fe-S podjednotky komplexu II, a to naznačuje, že dysfunkce komplexu II předchází smrti neuronů. U modelu kvasinek mutovaný huntingtin potlačil mitochondriální dýchání, a to snížením účinnosti komplexů II a III (64). Na druhou stranu u presymptomatických pacientů a myši exprimujících mutovaný huntingtin v plné délce, nebyl prokázán žádný významný defekt komplexů dýchacího řetězce. Poruchy dýchacího řetězce jsou tedy pravděpodobně až sekundárním znakem Huntingtonovy nemoci (65).

1.3.1.5 Další pozorované projevy

V temporální a frontální kůře mozku postižených pacientů se našly známky delecí u mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA je také velmi citlivá na zvýšený oxidační stres. Léze a poškození mitochondriální DNA byly prokázány u HD pacientů (66).

1.3.2 Mitochondriální onemocnění

Mitochondriální onemocnění lze rozdělit na dvě skupiny – primární a sekundární mitochondriální onemocnění. Primární mitochondriální onemocnění je způsobeno zárodečnými mutacemi v mitochondriální DNA nebo jaderné DNA, a to v úsecích kódující proteiny elektronového transportního řetězce (67). Defekt v mitochondriální DNA způsobuje například poruchy v komplexu I OXPHOS. To se projevuje svalovou slabostí, kardiomyopatií a abnormalitami v šedé a bílé hmotě mozku. Poruchy v jaderné DNA vedou ke kardiomyopatii, encefalomyopatii a způsobují jaterní a ledvinovou dysfunkci. Sekundární mitochondriální onemocnění se projevuje mnoha patologickými procesy, které nezahrnují geny v přímé souvislosti s mitochondriálními procesy. Vzniká například vlivem působení negativních účinků životního prostředí na organismus, které mají značný podíl na vzniku oxidačního stresu. Obecně sekundární onemocnění doprovází ztráta motorických neuronů, svalová slabost a kardiomyopatie (68). Běžně se pro diagnostiku poruch

OXPHOS využívá biopsie kosterního svalu (69). Snahou je nalézt příčiny nemocí u snadněji přístupných tkání. Snadno přístupnou tkání jsou například fibroblasty. Ty se používají v případě, kdy nemáme k dispozici vzorek svalové tkáně, kdy je potřebné prenatalní vyšetření plodu, dále k porovnání s výsledky získaných ze svalu a pro účely výzkumu. Fibroblasty mají i svá omezení. Oproti kosterní svalu se u fibroblastů nemusí objevit daná vada. Nenajde-li se vada u fibroblastů neznámá to, že není přítomna ve svalu, není tedy definitivní při potvrzení diagnózy. A ve svalech jsou výraznější enzymatické deficity, u fibroblastů nejsou tak výrazné (70). Funkce mitochondriálního metabolismu se pro účely výzkumu měří na různých přístrojích jako je například Seahorse XF Analyzers nebo Oxygraph-2k. Seahorse XF Analyzers měří míru spotřeby kyslíku, což je odrazem mitochondriálního dýchání, a extracelulární acidifikaci, která charakterizuje glykolýzu. Měření se provádí v reálném čase v mikrotitrační destičce s velmi malým objemem média nad vrstvou buněk. Buněčná spotřeba kyslíku a vylučování protonů způsobují rychlé a měřitelné změny koncentrace rozpuštěného kyslíku a protonů. Přístroj měří po dobu 2 až 5 minut a poté vypočítá spotřebu kyslíku a extracelulární acidifikaci (71). Oxygraph-2k měří mitochondriální respiometrii, viz dále.

1.3.3 Mitochondriální respiometrie

Mitochondriální respiometrie měří spotřebu kyslíku u mitochondrií. Kyslík je finální akceptor elektronů při syntéze ATP a měření jeho spotřeby je odrazem fungování OXPHOS.

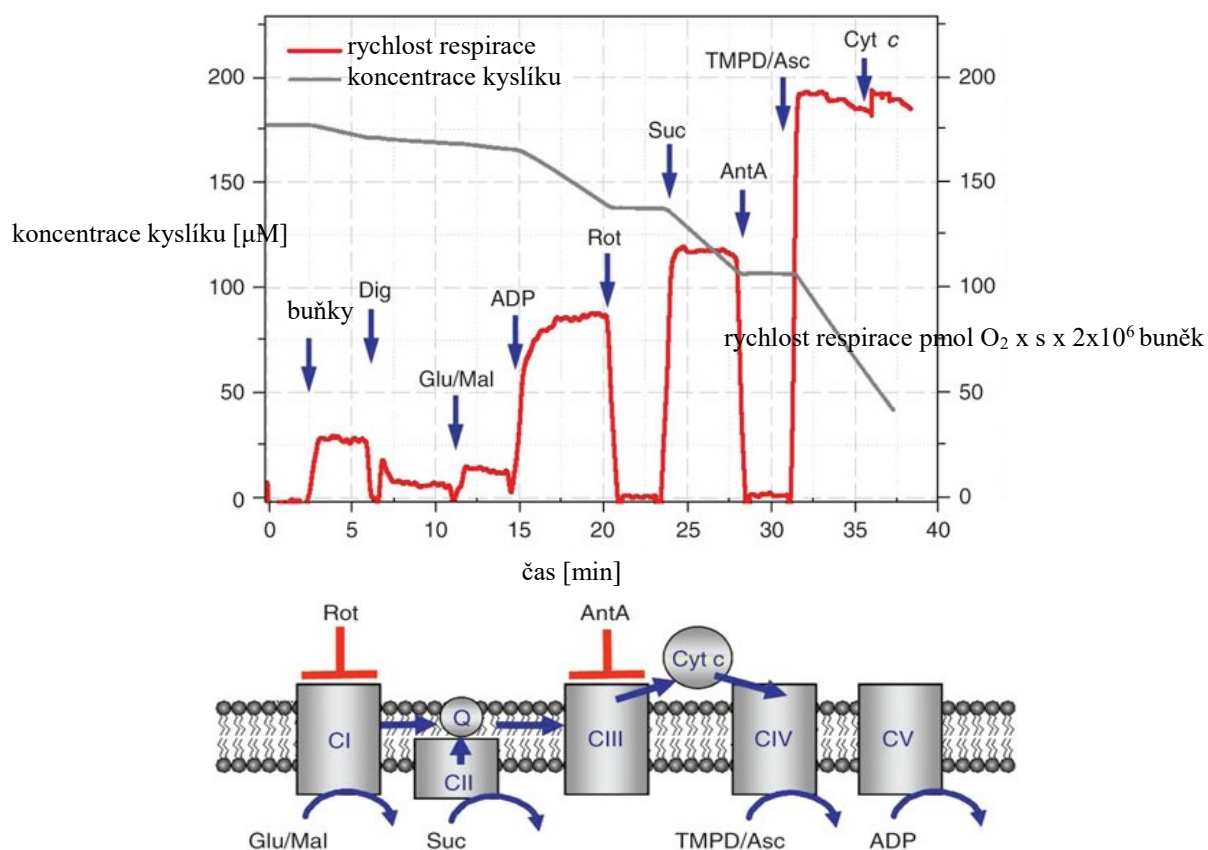
1.3.3.1 *Historie respiometrie*

Otto Warburg byl první, kdo přišel s přístrojem umožňujícím měření spotřeby kyslíku. Šlo o manometrický respiometr (měření tlaku v uzavřených prostorech), který měřil spotřebu kyslíku u tkáňových homogenátů nebo tkáňových řezů. Vodná fáze se intenzivně protřepe, aby se vyrovnala s plynnou fází. Tlak v plynné fázi úměrně klesá se spotřebou kyslíku (72). Princip Clarkovy kyslíkové elektrody v roce 1955 využili B. Chance a G. R. Williams k sestavení polarografického přístroje, který měřil respiraci izolovaných mitochondrií (73). V roce 1989 E. Gnaiger vyrobil předchůdce Oxygraphu a v roce 1992 se začal sériově vyrábět pod názvem Cyclobios Oxygraph. Přístroj je dvou komorový. Komory mohou být používány nezávisle na sobě nebo může jedna sloužit pro kontrolní měření. Každá komora má polarografický kyslíkový senzor (POS, z anglického Polarographic Oxygen Sensor).

Ten se skládá z Ag/AgCl anody a zlaté katody a je ponořen do roztoku elektrolytu KCl. POS je překrytý teflonovou membránou, která je propustná pro kyslík. Rozpuštěný kyslík v médiu putuje přes membránu ke zlaté katodě, kde je redukován na vodu. Na anodě vzniká proud oxidací Ag. Tento proud je přímo úměrný parciálnímu tlaku O₂ v roztoku a je přepočítán na koncentraci kyslíku (74). Pro zlepšení výsledků je POS umístěna šikmo přímo do oblasti maximálního proudu. Teplota výrazně ovlivňuje měření, proto je udržována vestavěným elektrickým Peltierovým tepelným čerpadlem. Uvnitř každé komory je umístěno sklem pokryté magnetické míchadlo, které se otáčí vlivem elektrického pole (75). Další vylepšení přišlo v roce 2001 a vznikl OROBOROS Oxygraph-2k s vysokým rozlišením.

1.3.3.2 Respirometrické měření

Analýza mitochondriálních funkcí je klíčovou při výzkumu mitochondriální fyziologie a diagnózy mnoha nemocí. Vyhodnocení parametrů oxidační fosforylace je zásadní pro zkoumání energetiky buňky, apoptózy a patofyziologie různých onemocnění, jako jsou například neurodegenerativní onemocnění, onkologická onemocnění, oxidační stres a stárnutí. Studium oxidační fosforylace se provádí u intaktních mitochondrií (76). Při měření se používá protokol, kde přidáváme substráty a inhibitory. Nejprve je vhodné pomocí digitoninu (Dg) rozrušit plazmatickou membránu. Kombinace substrátů pyruvát + malát (PM) a glutamát + malát (GM) poskytuje elektrony pro NAD⁺ a to se redukuje na NADH, které přináší elektrony do komplexu I. Přes komplexy III a IV putují elektrony od NADH až na kyslík. U komplexu II je donorem elektronů sukcinát (Su) a jeho oxidací je elektron přenesen na ubiquinon. Askorbát (Asc) a TMPD (2T) jsou donory elektronů pro komplex IV. ADP (D) je donorem elektronů pro komplex V. Asc se přidá jako první, aby udržel TMPD v redukovaném stavu. Při studiu jednotlivých komplexů používáme inhibitory – inhibitorem KI je rotenon (Rot) a KIII je antimycin A (Ama). Komplex IV je inhibován azidem (4Z). Cytochrom c (Cyt c) se používá k zjištění, zda nebyla porušena vnější mitochondriální membrána (Obr. 6. str. 26) (77).



Obr. 6. Příklad protokolu pro měření spotřeby kyslíku na přístroji OROBOROS.

Horní obrázek ukazuje respirometrický záznam. Dig – digitonin, Glu/Mal – glutamát/malát, Rot – rotenon, Suc – sukcinát, AntA – antimycin A, Asc – askorbát, Cyt c – cytochrom c, Q – koenzym Q. Dolní obrázek ukazuje místa působení inhibitorů a substrátů komplexů OXPHOS. (převzato a upraveno podle (78)).

2 Cíl práce

Huntingtonova choroba je neurodegenerativní onemocnění postihující mozek a projevující se charakteristickými samovolnými trhavými pohyby těla a snížením mentálních schopností.

V teoretické části:

Popsat hlavní charakteristiky Huntingtonovy nemoci se zaměřením dopadu HD na mitochondriální energetický metabolismus

V praktické části:

1. Analyzovat respiraci mitochondrií pomocí vysoce citlivé polarografie v souboru 3 linií fibroblastů od pacientů s Huntingtonovou chorobou
2. Porovnat tyto výsledky s kontrolními liniemi

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Všechna měření byla prováděna na liniích kultivovaných lidských kožních fibroblastů od různých pacientů nebo kontrol.

3.1.1 Kontrolní linie

V předkládané práci byly použity 3 linie od pacientů s Huntingtonovou chorobou a 3 linie kontrolní (Tab. 01.).

Tab. 01.: Soubor pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol pro experimentální část předkládané práce

Linie	Věk [roky]	Klinický obraz	Pasáž
P1	63	klasická forma délka nemoci 32 let CAG 19/44 chorea, dystonie, demence, kachexie, úmrtí v 63 letech	10
P2	30	juvenilní forma délka nemoci 10 let imobilita, dysfagie, dysartrie, demence	10
P3	40	klasická forma CAG 25/45 délka nemoci 12 let generalizovaný choreatický syndrom, poruchy krátkodobé paměti	4+
K1	25	zdravá kontrola	14
K2	30	zdravá kontrola	12
K3	<18	zdravá kontrola	10

P – pacient, K – kontrola

3.2 Použité chemikálie

ADP	Sigma (USA)
Antimycin A	Sigma (USA)
Askorbát sodný	Sigma (USA)
Azid sodný	Penta (ČR)
BSA	Sigma (USA)
Cytochrom <i>c</i>	Sigma (USA)
Deoxycholát sodný	Sigma (USA)
Digitonin	Sigma (USA)
DMSO	Sigma (USA)
EDTA	Sigma (USA)
Ethanol (96%)	Penta (ČR)
FCCP	Sigma – Aldrich
Fosforečnan draselný	Fluka (Švýcarsko)
Glukóza	Sigma (USA)
Glutamát sodný	Sigma (USA)
Hydroxid sodný	Penta (ČR)
Chlorid draselný	Penta (ČR)
Chlorid hořečnatý	Sigma (ČR)
Chlorid sodný	Penta (ČR)
Malát	Sigma (USA)
Rotenon	Sigma (USA)
Sukcinát sodný	Sigma – Aldrich (USA)
Síran měďnatý	Penta (ČR)
TMPD	Sigma (USA)
Tris	Sigma (USA)

Tris-HCl	Sigma – Aldrich (USA)
Triton X-100	Sigma (USA)
Uhličitan sodný	Penta (ČR)
Vinan sodnodraselný	Sigma – Aldrich (USA)

Komerčně dodávané roztoky:

ATB – Antibiotický a antimykotický roztok (100x) Biosera (Francie)

DMEM Biochrom (Německo)

FBS Sigma (USA)

Folinovo reagens Penta (ČR)

PBS Lonza (Švýcarsko)

[10x koncentrovaný: 56 mM Na₂HPO₄, 1,54 M NaCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7,4]

PIC Sigma – Aldrich (USA)

T + E roztok (Trypsin + EDTA roztok) Biosera (Francie)

[0,05% (w/v) trypsinu, 0,02% (w/v) EDTA v roztoku PBS]

V laboratoři připravená média a roztoky:

KCl médium [80 mM KCl, 10 mM Tris, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM K₃PO₄.H₂O, pH 7,4]

RIPA pufr [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF, 1 mM EDTA; 1% (v/v) Triton X-100; 1% (w/v) deoxycholát sodný; 0,1 % (w/v) SDS; 1% (v/v) PIC]

Roztok Lowry A [0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na₂CO₃]

Roztok Lowry B [0,5% (w/v) CuSO₄]

Roztok Lowry C [1% (w/v) vinan sodnodraselný]

BSA – roztok pro kalibrační přímku 3.4.7

3.3 Použité přístroje

Analytické váhy ABT 220-50M	Kern (Německo)
Analytické váhy HA – 120M	Helago (Japonsko)
Autokláv MAC – 235EX	Sanyo (Japonsko)
Autokláv MLS – 3020U	Sanyo (Japonsko)
CCD kamera DP50	Olympus (Japonsko)
Centrifuga Mikro 200	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 32R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Centrifuga Universal 320R	Hettich Zentrifugen (Německo)
Laminární box Air Clean	AirClean Systems (USA)
Mikropipety (automatické pipety)	Eppendorf (Německo)
	Gilson (USA)
	Thermo Scientific (USA)
	Nichiryo (USA)
Mikroskop Nikon Diaphot 200	Nikon (Japonsko)
Oxygraph-2k	Oroboros (Rakousko)
pH metr 774	Metrohm (Švýcarsko)
Spektrofotometr UV-2401PC	Shimadzu (Japonsko)
Termostat TCH100	Laboratorní přístroje Praha (ČR)
Termostat Sanyo CO ₂ incubator	Sanyo (Japonsko)

Vortex-Genie 2

Scientific Industries (USA)

Vortex 2x³

Velp Scientifica (Italie)

3.4 Metody

3.4.1 Skladování a rozmrazování buněk

Lidské kožní fibroblasty, které byly skladovány v kryozkumavkách naplněných 1,8 ml média DMEM s 10% (v/V) iFBS, 7,5% (v/V) DMSO a 1% (v/V) ATB při teplotě -196°C, byly nejprve rozmrazeny ve 37°C (termostat Heratherm IMC 18, Thermo Scientific) a poté přeneseny do kultivační lahve o ploše 75 cm². Dále k těmto buňkám bylo přidáno 10 ml DMEM média s 10% (v/V) iFBS a 1% (v/V) ATB a byly umístěny do termostatu (37°C, 5% koncentrace CO₂, termostat Sanyo CO₂).

3.4.2 Sklízení a zamrazování fibroblastů

Fibroblastům, které narostly tak, že pokryly kolem 70-80% lahve bylo odebráno médium, kultivační plocha byla opláchnuta 5 ml PBS. Bylo přidáno 1,5 ml roztoku T+E a buňky byly umístěny do termostatu (37°C, 5% koncentrace CO₂, termostat Sanyo CO₂ incubator, Sanyo). Po 5 minutách bylo pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) zkontrolováno, zda došlo k uvolnění fibroblastů ze dna lahve vlivem T+E roztoku. Po uvolnění fibroblastů bylo přidáno 12 ml média DMEM s 10% (v/V) iFBS a 1% (v/V) ATB. Obsah kultivačních lahví byl resuspendován a přenesen do sterilní 15 ml centrifugační zkumavky. Dále byly centrifugovány (300g, 25°C, 5 minut, centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen), sediment buněk byl resuspendován v médiu DMEM 10% (v/V) iFBS, 7,5% (v/V) DMSO a 1% (v/V) ATB a 2 ml suspenze buněk bylo přeneseno do kryozkumavek. Zkumavky byly 24 hodin ponechány v -80°C ve speciální zamrazovací nádobě (CoolCell®) a poté přendány do -196°.

3.4.3 Kultivace fibroblastů

Fibroblasty byly kultivovány v kultivačních lahvích o ploše 75 cm² ve 12 ml DMEM média s 10% (v/V) iFBS, 25 mM glukózou (4,5 g.l⁻¹), 2 mM L-glutaminem (0,580 g.l⁻¹) a 1% (v/V) ATB. Fibroblastům, které narostly tak, že pokryly kolem 95% lahve a byly u nich pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) pozorovány mitózy, byly pasážovány a to tak, že bylo odebráno médium, kultivační plocha byla opláchnuta 5 ml PBS. Následně PBS bylo odebráno, bylo přidáno 1,5 ml roztoku T+E a buňky byly umístěny do termostatu (37°C, 5% koncentrace CO₂, termostat Sanyo CO₂ incubator, Sanyo). Po 5 minutách bylo pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) zkontrolováno, zda došlo

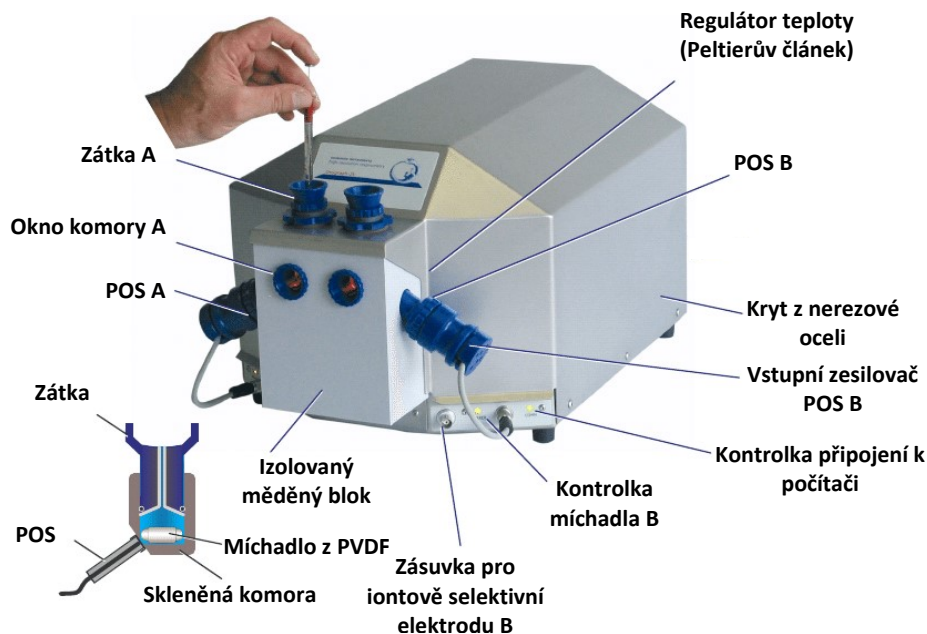
k uvolnění fibroblastů ze dna lahve vlivem T+E roztoku. Po uvolnění fibroblastů bylo přidáno DMEM médium s 10% (v/V) iFBS a 1% (v/V) ATB, obsah lahve byl rozdělen do dvou 75 cm² lahví a doplněn médiem DMEM s 10% (v/V) iFBS a 1% (v/V) ATB na celkový objem 12 ml. Kultivace probíhala po dobu 3-7 dnů v termostatu (37°C, 5% koncentrace CO₂, termostat Sanyo CO₂ incubator, Sanyo).

3.4.4 Sklízení fibroblastů pro účely respirometrie

Koční fibroblasty, které narostly tak, že pokryly kolem 80% lahve a byly u nich pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) pozorovány mitózy, byly zdokumentovány (CCD kamera DP50, Olympus). Poté bylo odebráno médium a přeneseno do kádinky, kultivační plocha byla opláchnuta 5 ml PBS. Následně bylo odebráno PBS, bylo přidáno 1,5 ml roztoku T+E a buňky byly umístěny do termostatu (37°C, 5% koncentrace CO₂, termostat Sanyo CO₂ incubator, Sanyo). Po 5 minutách bylo pod mikroskopem (Nikon Diaphot 200, Nikon) zkontrolováno, zda došlo k uvolnění fibroblastů ze dna lahve vlivem T+E roztoku. Po uvolnění fibroblastů bylo vráceno původní médium zpět. Obsah byl přenesen do 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugován (300g, 22°C, 5 minut, centrifuga Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen). Supernatant byl odlit a peleta rozpuštěna v 1 ml chlazeného PBS. Obsah byl přenesen do 15 ml centrifugační zkumavky, bylo přidáno 9 ml chlazeného PBS a centrifugován (300g, 4°C, 5 minut, centrifuga Universal 320R, Hettich Zentrifugen). Promývání bylo ještě jednou zopakováno, ale k peletě bylo přidáno 11 ml chlazeného PBS. Po centrifugování byla peleta opět resuspendována v 50 µl PBS a bylo odebráno 20 µl, ve kterých byla stanovena koncentrace proteinu (podle Lowryho, 3.4.7). Zbytek suspenze byl použit pro měření na přístroji Oxygraph-2k (OROBOROS).

3.4.5 Respirometrie

Komory Oxygraphu-2k (OROBOROS) (Obr. 7., str. 25) byly důkladně promyty 96% ethanolem a třikrát destilovanou vodou. Poté bylo napipetováno do obou komor 2100 µl média (KCl) a bylo ponecháno v otevřených komorách 30 minut (za stálého míchání při 37°C). Poté byl odebrán z obou komor stejný objem média, podle objemu přidanych buněk (většinou 40 µl), komory byly uzavřeny, byla přidána suspenze fibroblastů a po ustálení respirace bylo zahájeno měření. Nejprve byly buňky permeabilizovány 1-3 µl 8 mM digitoninu (v závislosti na množství buněk) a byla změřena spotřeba kyslíku. Dále byly



Obr. 7. Schéma přístroje Oxygraph-2k (OROBOROS). Přístroj se skládá ze 2 dvou komor (A a B) o objemu 1 ml. Ty jsou umístěny v izolovaném měděném bloku, který má regulovatelnou teplotu pomocí Peltierova článku. Dále obsahuje dva polarografické kyslíkové senzory, které snímají koncentraci kyslíku v komorách. Komory jsou uzavřeny zátkou, ve které je kapilára pro titrování roztoků. Obsah komor je míchán míchadlem z PVDF. (převzato a upraveno podle www.oroboros.at).

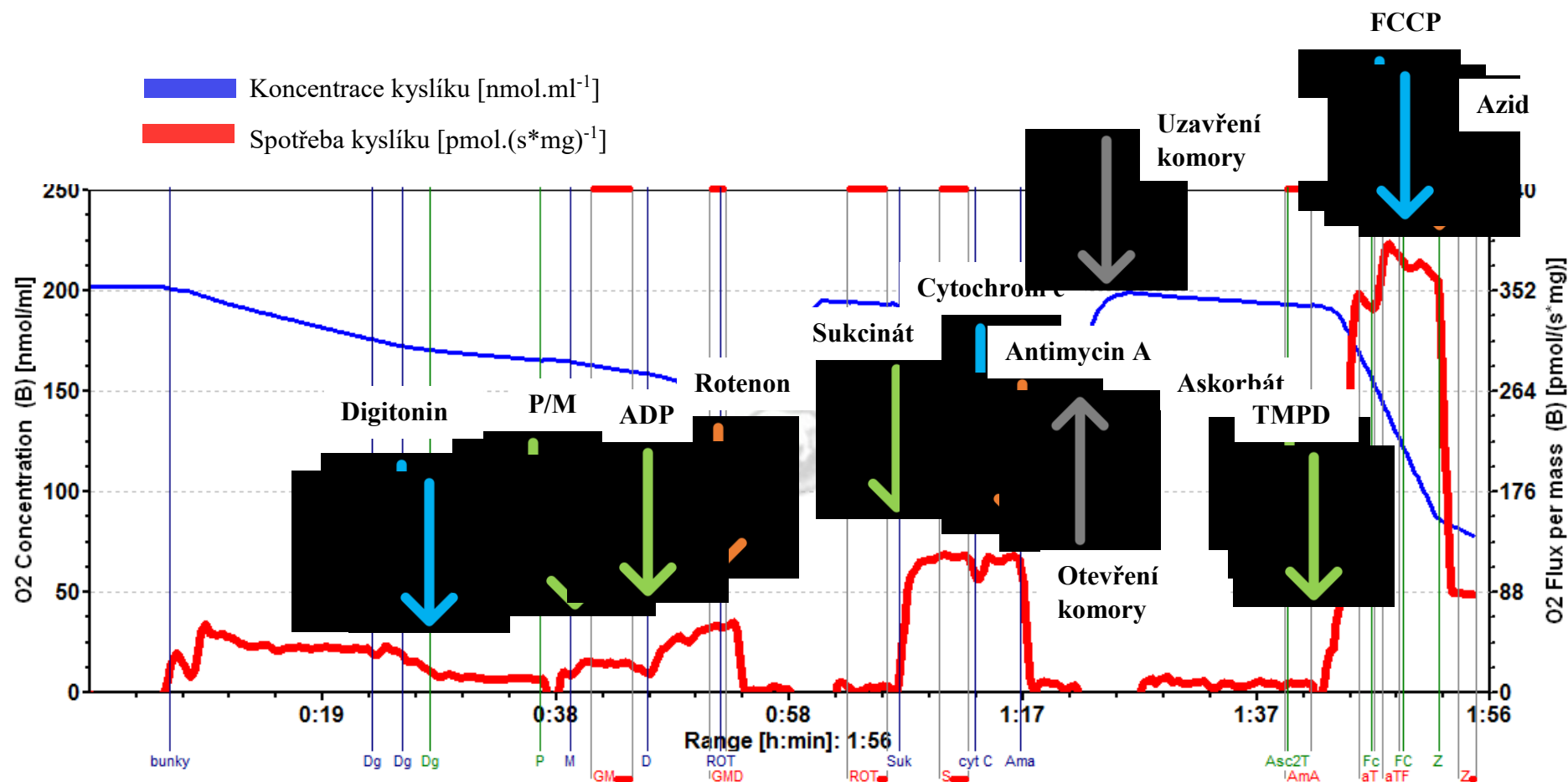
Zda nebyla porušena vnější mitochondriální membrána bylo testováno pomocí cytochromu c. Komplex III byl inhibován přídatkem antimycinu A a byly přidány askorbát a TMPD jako substráty komplexu IV. Na závěr byl přidán rozpřahovač FCCP a komplex IV byl inhibován azidem sodným.

Tab. 02.: Pořadí přidávaných substrátů, inhibitorů a rozpřahovače v průběhu měření respirace fibroblastů na přístroji Oxygraph-2k (OROBOROS)

Pořadí	Substrát/inhibitor/rozpřahovač	Koncentrace zásobního roztoku (rozpouštědlo)	Přidávaný objem	Teplota skladování zásobních roztoků
1.	Glutamát/Pyruvát	1M (H ₂ O)	20 µl	-20°C
2.	Malát	1M (H ₂ O)	6 µl	-20°C
3.	ADP + Mg ²⁺	0,5M (H ₂ O)	4 µl	-80°C
4.	Rotenon	0,5mM (EtOH)	1 µl	-20°C
5.	Sukcinát	1M (H ₂ O)	20 µl	-20°C
6.	Cytochrom c	2mM (H ₂ O)	5 µl	-20°C
7.	Antimycin A	1mM (EtOH)	1 µl	-20°C
8.	Askorbát	0,2M (H ₂ O)	25 µl	-20°C
9.	TMPD	40mM (H ₂ O)	45 µl	-20°C
10.	FCCP	1mM (EtOH)	0,2-0,4 µl	-20°C
11.	Azid sodný	4M (H ₂ O)	5 µl	-20°C

3.4.6 Analýza výsledné křivky spotřeby kyslíku

Naměřená respirace byla vztažena na množství proteinu v komoře. Množství proteinu bylo stanoveno podle Lowryho (kapitola 3.4.7). Dále byla respirace vyhodnocena v programu DatLab5 (OROBOROS) (Obr. 8 str. 37) a statisticky zpracována v programu Excel (Microsoft Office).



Obr. 8. Záznam z měření spotřeby O₂ kultivovaných lidských kožních fibroblastů na přístroji Oxygraph-2k (OROBOROS) získaný pomocí programu DatLab5. Modrá křivka znázorňuje aktuální koncentraci kyslíku v komoře, červená křivka spotřebu kyslíku na množství proteinu. Nejprve došlo k rozrušení vnější mitochondriální membrány pomocí digitoninu (Dg) a dále byly přidávány substráty, inhibitory a rozpřahovače v pořadí: glutamát (G)/ pyruvát (P), malát (M), ADP (D), rotenon (Rot), sukcinát (Suk), cytochrom c (Cyt c), antimycin A (Ama), askorbát (Asc), TMPD (2T), FCCP (Fc) a azid (Z). Výsledná respirace byla vztažena na množství proteinu. Červené šipky znázorňují přidávané inhibitory (rotenon, antimycin A, azid), zelené šipky substráty (glutamát, malát, ADP, sukcinát, askorbát a TMPD) a modré šipky další přidávané látky (digitonin, cytochrom c, FCCP). Spotřeba O₂ byla odečtena v oblastech vymezených červeným úsekem.

3.4.7 Stanovení proteinů podle Lowryho

Buněčná suspenze získaná ze sklizených fibroblastů (kapitola 3.4.4.) byla při laboratorní teplotě, aby došlo k jejímu rozmražení. Dále byla provedena lýza buněk, a to pomocí směsi 1% PIC v 1 ml RIPA pufru. Po rozmrznutí bylo k buňkám přidáno 180 μ l směsi PIC+RIPA pufru a směs byla ponechána 20 minut na ledu a každých 5 minut byla promíchána (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Ze vzorku bylo pro stanovení proteinu odebráno 2 x 5 μ l a 1 x 7 μ l. Dále byla vytvořena roztokem BSA a destilované vody standardní kalibrační křivka, z níž byla odečtena koncentrace proteinu ve vzorku, objemy BSA a destilované vody jsou uvedeny v Tab. 03. Dále byly vzorky doplněny destilovanou vodou na celkový objem 200 μ l a byl přidán 1 ml roztoku, který vznikl smícháním roztoků A, B a C (složení roztoků viz 3.2.) v poměru 48:1:1. Všechny vzorky byly vortexovány (Vortex 2x³, Velp Scientifica) a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Folinovo reagens bylo naředěno vodou v poměru 1:1 a 100 μ l bylo přidáno ke vzorkům a ihned mícháno (Vortex 2x³, Velp Scientifica). Po 30 minutách byla u vzorků o laboratorní teplotě proměřena absorbance při 700 nm (UV-2401PC, Shimadzu).

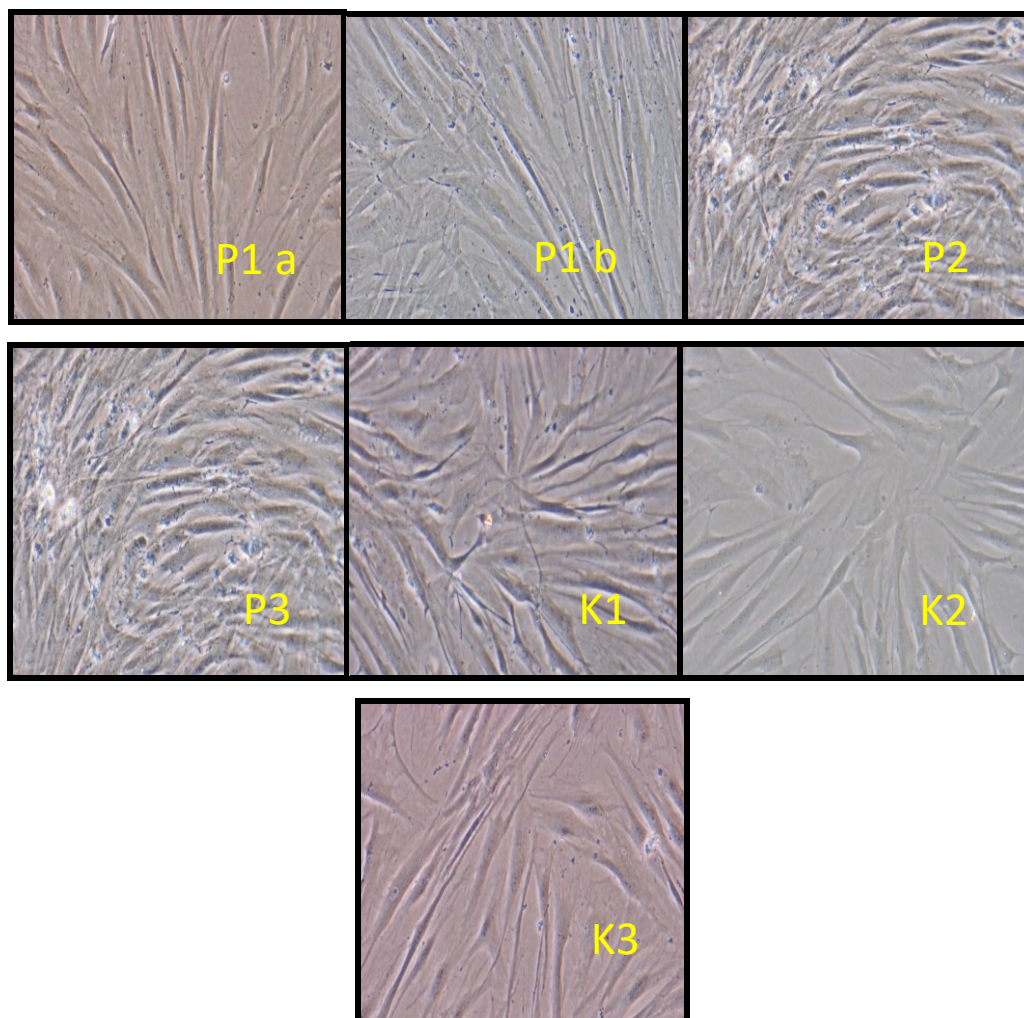
Tab. 03.: Objemy BSA a vody pro vytvoření standardní kalibrační křivky

Číslo zkumavky	Objem vody [μ l]	Objem BSA [μ l]	Koncentrace [μ g]
1. (blank)	200	-	-
2.	175	25	5,0
3.	150	50	10,0
4.	125	75	15,0
5.	100	100	20,0
6.	75	125	25,0

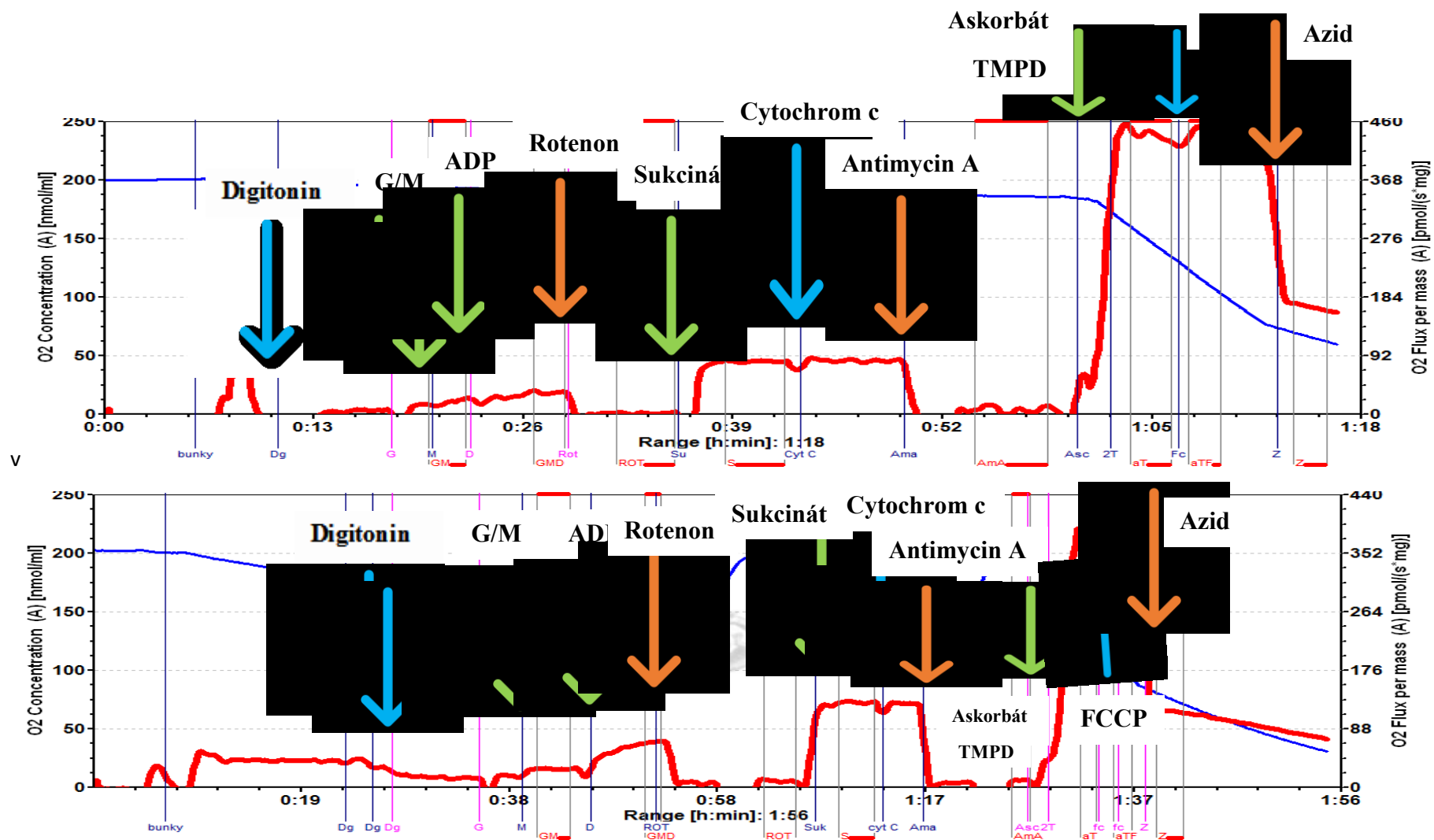
4 Výsledky

K měření byla použita linie kultivovaných lidských kožních fibroblastů od 3 pacientů (P1-P3) nebo kontrol (K1-K3).

4.1 Kontrola růstu fibroblastů



Obr. 09.: Kontrola růstu fibroblastů od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol kultivovaných v médiu DMEM před měřením spotřeby kyslíku. Linie byly kultivovány do konfluency přibližně 80 % v médiu DMEM a následně snímány CCD kamerou DP50. K1 – kontrola 1, K2 – kontrola 2, K3 – kontrola 3, P1 a – pacient 1 první měření, P1 b – pacient 1 druhé měření, P2 – pacient 2, P3 – pacient 3.



Obr. 10.: Záznam z měření spotřeby O₂ v kultivovaných kožních fibroblastech od pacienta P3 s Huntingtonovou chorobou (dole) a kontrolní linie K3 (nahore) na přístroji Oxygraph-2k (program DatLab 5, OROBOROS). Modrá křivka zobrazuje aktuální koncentraci kyslíku v komoře, červená křivka ukazuje spotřebu kyslíku vztaženou na množství proteinu. V průběhu měření byl přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozprahovač pro OXPHOS v pořadí: P – pyruvát, M – malát, D – ADP, Rot – rotenon, Suk – sukcinát, Cyt c – cytochrom c, Ama – antimycin A, Asc – askorbát, 2T – TMPD, Fc – FCCP, Z- azid.

4.2 Stanovení koncentrace podle Lowryho

Metodou stanovení bílkovin podle Lowryho bylo stanoveno množství proteinu v suspenzi v mg/ml. Respirometrie byla prováděna ve dvou verzích, jednou s použitím glutamátu, podruhé s pyruvátem. Pacient 1 byl měřen dvakrát.

Tab. 04.: Množství proteinu obsaženém v suspenzi a v komoře. Stanoveno podle Lowryho.

Linie	Koncentrace proteinu v suspenzi na 1 μ l [g]	Množství proteinu v komoře [mg/ml]
P1 a	2,109	0,843
P1 b	2,835	1,134
P2	2,694	1,078
P3	3,709	0,742
K1	0,958	0,383
K2	1,926	0,770
K3	2,112	0,845

4.3 Výsledky měření s glutamátem

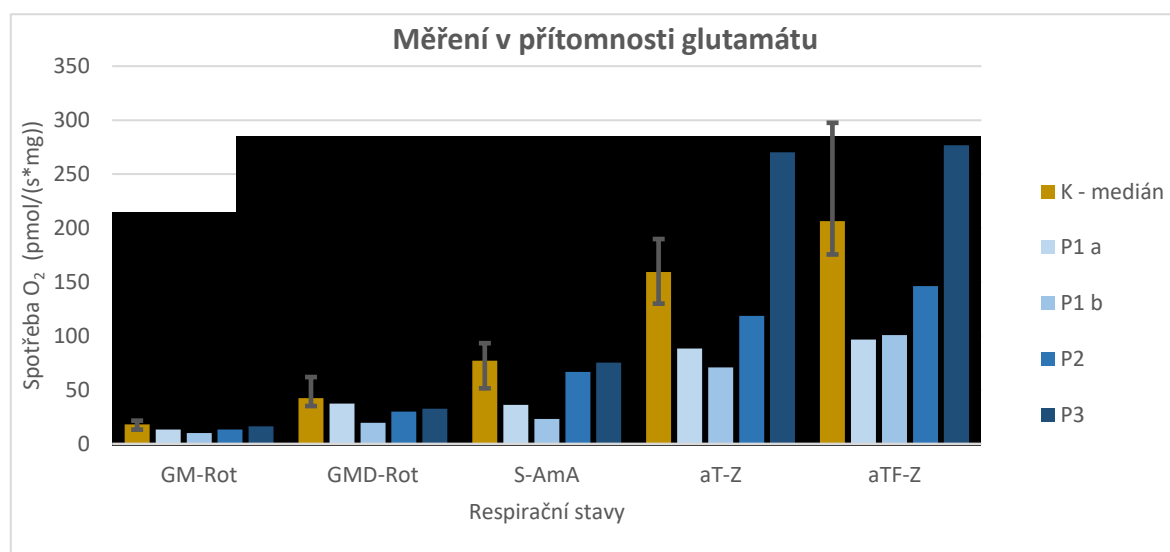
Při tomto měření byl jako jeden ze substrátů použit glutamát. Pro lepší porovnání, z důvodu malého množství vlastních měřených kontrol, byly použity i výsledky z měření publikované v diplomové práci Expresse vybraných defektů oxidativní fosforylace na úrovni kultivovaných fibroblastů studentky Michaely Markové v Praze v roce 2015.

4.3.1 Respirační stavy

Tab. 05.: Hodnoty respirace od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol. Z výsledků měření kontrol byl stanoven medián. K – kontroly, P1 a – pacient 1 první měření, P1 b – pacient 1 druhé měření, P2 – pacient 2, P3 – pacient 3, G – glutamát, M – malát, D – ADP, Rot - rotenon, Suk - sukcinát, Cyt c - cytochrom c, Ama - antimycin A, Asc - askorbát, 2T - TMPD, Fc – FCCP, Z- azid.

	Spotřeba O ₂ [pmol/(s*mg)]				
	GM-Rot	GMD-Rot	S-Ama	aT-Z	aTF-Z
K – medián	18,11	42,54	77,15	159,17	206,47
P1 a	13,27	37,26	36,09	88,33	96,68
P1 b	9,98	19,64	23,21	70,87	100,97
P2	13,28	29,94	66,83	118,73	146,37
P3	16,49	32,69	75,34	270,18	276,86

Ze získaných hodnot spotřeby kyslíku byl vytvořen graf (Obr. 11). V grafu je znázorněna u mediánu kontrol chybová úsečka, kde kladnou chybovou hodnotou je 1. kvartil, tedy 25. percentil dat, a zápornou chybovou hodnotou je 3. kvartil, tedy 75. percentil dat.



Obr. 11.: Spotřeba O₂ v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol. Výsledná koncentrace byla vztažena na množství proteinu. V průběhu měření byl přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v pořadí: G – glutamát, M – malát, D – ADP, Rot - rotenon, Suk - sukcinát, Cyt c - cytochrom c, Ama - antimycin A, Asc - askorbát, 2T - TMPD, Fc – FCCP, Z- azid.

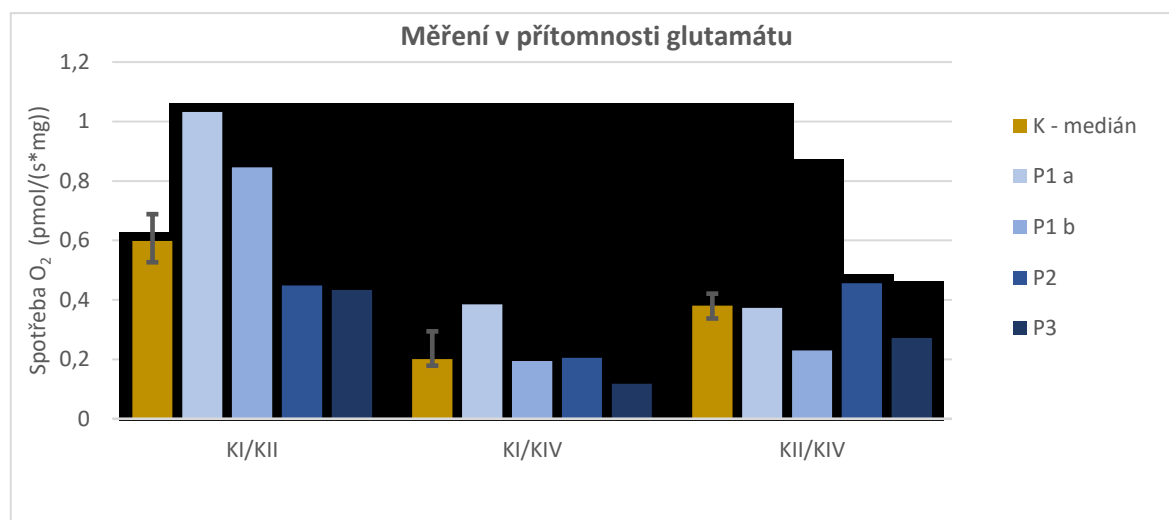
4.3.2 Poměry respiračních stavů

U tohoto měření byly vyloučeny výsledky K1, protože vykazovaly záporné hodnoty.

Tab. 06.: Hodnoty respirace od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol v přítomnosti glutamátu. Z výsledků měření kontrol byl stanoven medián. K – kontroly, P1 a – pacient 1 první měření, P1 b – pacient 1 druhé měření, P2 – pacient 2, P3 – pacient 3, KI – komplex I, KII – komplex II, KIV – komplex IV.

	Spotřeba O ₂ [pmol/(s*mg)]		
	KI/KII	KI/KIV	KII/KIV
K – medián	0,599	0,200	0,381
P1 a	1,032	0,385	0,373
P1 b	0,846	0,195	0,230
P2	0,448	0,205	0,457
P3	0,434	0,118	0,272

Ze získaných hodnot spotřeby kyslíku byl vytvořen graf (Obr. 12). V grafu je znázorněna u mediánu kontrol chybová úsečka, kde kladnou chybovou hodnotou je 1. kvartil, tedy 25. percentil dat, a zápornou chybovou hodnotou je 3. kvartil, tedy 75. percentil dat.



Obr. 12.: Poměry spotřeby O₂ v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol v přítomnosti glutamátu. Výsledná koncentrace byla vztažena na množství proteinu. V průběhu měření byl přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpráhovač pro OXPHOS v pořadí: G – glutamát, M – malát, D – ADP, Rot – rotenon, Suk – sukcinát, Cyt c – cytochrom c, Ama – antimycin A, Asc – askorbát, 2T – TMPD, Fc – FCCP, Z – azid.

4.4 Výsledky měření s pyruvát

Při tomto měření byl jako jeden ze substrátů použit pyruvát. Pro lepší porovnání, z důvodu malého množství vlastních měřených kontrol, byly použity i výsledky z měření publikované v diplomové práci Expres vybraných defektů oxidativní fosforylace na úrovni kultivovaných fibroblastů studentky Michaely Markové v Praze v roce 2015.

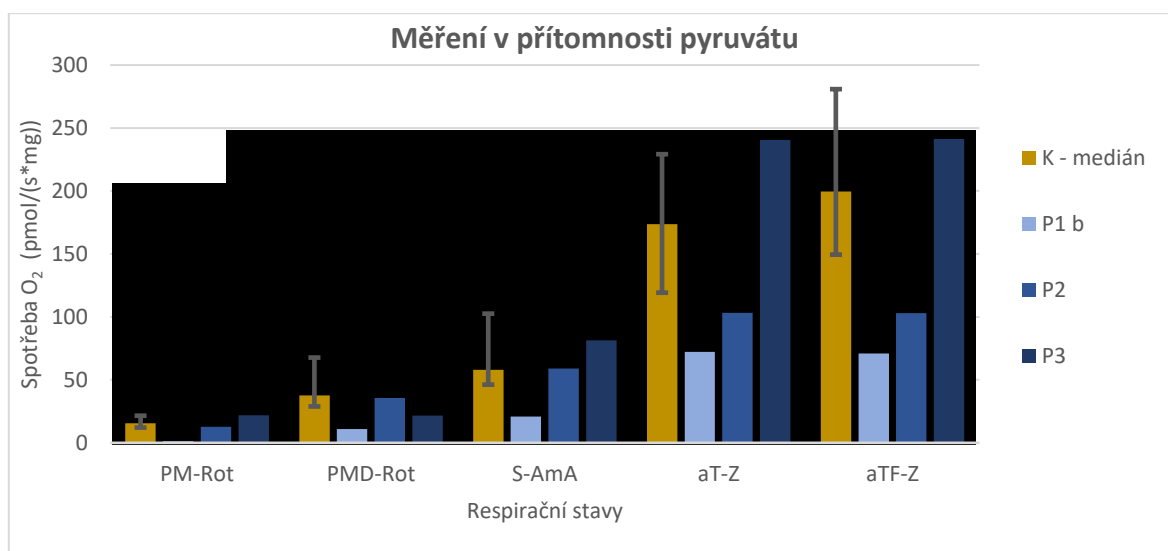
4.4.1 Respirační stavy

U tohoto měření byly vyloučeny výsledky P1 a, protože vykazovaly záporné hodnoty.

Tab. 07.: Hodnoty respirace od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol v přítomnosti pyruvátu. Z výsledků měření kontrol byl stanoven medián. K – kontroly, P1 a – pacient 1 první měření, P1 b – pacient 1 druhé měření, P2 – pacient 2, P3 – pacient 3, P – pyruvát, M – malát, D – ADP, Rot - rotenon, Suk - sukcinát, Cyt c - cytochrom c, Ama - antimycin A, Asc - askorbát, 2T - TMPD, Fc – FCCP, Z- azid.

	Spotřeba O ₂ [pmol/(s*mg)]				
	PM-Rot	PMD-Rot	S-Ama	aT-Z	aTF-Z
K – medián	15,61	37,68	57,87	173,71	199,53
P1 a	13,18	20,25	11,80	-43,04	16,82
P1 b	1,36	10,93	20,99	72,18	71,04
P2	12,78	35,52	58,89	103,26	102,99
P3	21,77	21,60	81,47	240,55	241,24

Ze získaných hodnot spotřeby kyslíku byl vytvořen graf (Obr. 13 str. 45). V grafu je znázorněna u mediánu kontrol chybová úsečka, kde kladnou chybovou hodnotou je 1. kvartil, tedy 25. percentil dat, a zápornou chybovou hodnotou je 3. kvartil, tedy 75. percentil dat.



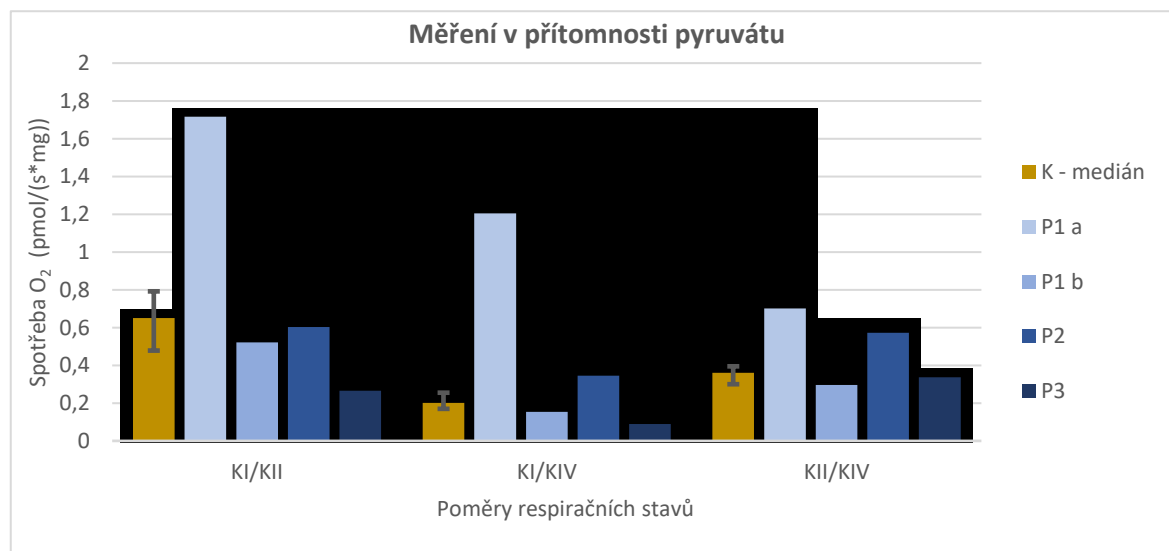
Obr. 13.: Spotřeba O₂ v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol. Výsledná koncentrace byla vztažena na množství proteinu. V průběhu měření byl přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpřahovač pro OXPHOS v pořadí: P – pyruvát, M – malát, D – ADP, Rot - rotenon, Suk - sukcinát, Cyt c - cytochrom c, Ama - antimycin A, Asc - askorbát, 2T - TMPD, Fc – FCCP, Z- azid.

4.4.2 Poměry respiračních stavů

	Spotřeba O ₂ [pmol/(s*mg)]		
	KI/KII	KI/KIV	KII/KIV
K – medián	0,651	0,201	0,359
P1 a	1,716	1,204	0,702
P1 b	0,521	0,154	0,295
P2	0,603	0,345	0,572
P3	0,265	0,090	0,338

Tab. 08.: Hodnoty respirace od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol v přítomnosti pyruvátu. Z výsledků měření kontrol byl stanoven medián. K – kontroly, P1 a – pacient 1 první měření, P1 b – pacient 1 druhé měření, P2 – pacient 2, P3 – pacient 3, KI – komplex I, KII – komplex II, KIV – komplex IV.

Ze získaných hodnot spotřeby kyslíku byl vytvořen graf (Obr. 14). V grafu je znázorněna u mediánu kontrol chybová úsečka, kde kladnou chybovou hodnotou je 1. kvartil, tedy 25. percentil dat, a zápornou chybovou hodnotou je 3. kvartil, tedy 75. percentil dat.



Obr. 14.: Poměry spotřeby O₂ v kultivovaných kožních fibroblastech od pacientů s Huntingtonovou chorobou a kontrol v přítomnosti pyruvátu. Výsledná koncentrace byla vztažena na množství proteinu. V průběhu měření byl přidáván detergent, substráty, inhibitory a rozpráhovač pro OXPHOS v pořadí: P – pyruvát, M – malát, D – ADP, Rot – rotenon, Suk – sukcinát, Cyt c – cytochrom c, Ama – antimycin A, Asc – askorbát, 2T – TMPD, Fc – FCCP, Z – azid.

5 Diskuze

Při práci byly měřeny linie kultivovaných kožních fibroblastů od pacientů a zdravých kontrol. Cílem měření bylo zjistit, zda došlo ke změnám v respiračním řetězci nemocných pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Měření se provádělo na přístroji Oxygraph-2k. Jednou z výhod tohoto přístroje je, že umožňuje diagnostiku mnoha mitochondriálních cest a defektů v jednom jediném testu. Měří se živé buňky v reálném čase. Při měření se používá polarografický kyslíkový senzor, který zajišťuje vysokou přesnost výsledků a kontrolu kvality ve vysokém rozlišení. Nevýhodou je vyšší náročnost na čas a je nutné postupné přidávání substrátů a inhibitorů a sledování průběhu měření.

Při měření respirace je patrný pokles respirace u všech 4 pacientů po přidání substrátů komplexu I spolu s glutamátem, stejně tak u všech čtyř pacientů při přidání substrátů komplexu II i komplexu IV (Obr. 11 str. 42). U poměrů respirace jednotlivých komplexů pozorujeme snížení respirace u 2 ze 4 pacientů u poměru KI/KII, stejně tak u poměru KI/KIV a u poměru KII/KIV je patrný pokles u 3 ze 4 pacientů (Obr. 12 str. 43).

Při měření, kdy byl glutamát nahrazen pyruvátem, je pokles respirace komplexu I pozorován u všech 3 pacientů, u komplexu II pokles vykazuje 1 ze 3 pacientů a u komplexu IV 2 ze 3 pacientů (Obr. 13 str. 45). Z poměrů respiračních stavů je opět vidět pokles u poměru KI/KII a to u 3 ze 4 pacientů, u poměru KI/KIV u 2 ze 4 a stejně tak u poměru KII/KIV (Obr. 14 str. 46).

Roli na výsledky měření má i počet pasáží. Obecně platí, že je lepší méně pasáží, protože buňky budou čerstvější a budou vykazovat odpovídající aktivitu a respiraci. Buňky po násobném pasážování jsou vyčerpané a nevykazují takovou aktivitu jako ty méně pasážované a nemusí být zachycena jejich skutečná respirace. Ve studii jsme použili linie, které byly pasážovány u P1 a P2 10krát. P3 byl pasážován 4+. U tohoto pacienta obecně při všech měření sledujeme vyšší respiraci než u zbylých dvou.

Pacienta P1 jsme měřili dvakrát s rozstupem 3 týdnů. U obou měření byla pasáž provedena 10krát za stejných podmínek. Také měření proběhlo za stejných podmínek. Přesto se respirační stavy a poměry respirace výrazně liší. Odlišnosti mohou být způsobeny délkou zmrazení buněk, jejich manipulací při rozmrazování, dalším faktorem může být i počet buněk, který byl získán po 10 pasážích. Nemusela být každá lahev plně porostlá a při

sklizení mohlo také dojít ke ztrátám. Není ani vyloučena možná chyba přístroje Oxygraph-2k. Při prvním měření pozorujeme normální průběh respirace. Ovšem u druhého měření, kde byl použit pyruvát jako jeden ze substrátů komplexu I, pozorujeme velmi nízké hodnoty respirace a po přidání substrátů komplexu III dokonce záporné hodnoty. Pro bylo toto druhé měření vyřazeno z výsledků. Druhé měření již vykazovala odpovídající hodnoty. U měření s glutamátem takové vychýlení respirace nepozorujeme. Jeho hodnoty jsou lehce vyšší než hodnoty při prvním měření.

Porovnáváme-li jednotlivé poměry respiračních stavů vzájemně, pozorujeme výrazné snížení hlavně u komplexu II. Tomu odpovídají i klinické obrazy a neuropatologie odpovídající Huntingtonově nemoci (viz. 1.3.1.4). Při porovnání jednotlivých pacientů se zaměřením na komplex II s ohledem na dobu nemoci pozorujeme u pacienta P1, který trpěl danou nemocí 32 let a měl mnoho příznaků, je pokles respirace o 30% nižší než u PII, který trpí nemocí 10 let. PII s horšími projevy nemoci má jen o 9% menší respiraci než PIII, který trpí nemocí 12 let, ale má mnohem lehčí projevy Huntingtonovy nemoci. U komplexu I je situace obdobná. U komplexu IV je pozorované značné zvýšení respirace. Speciálně u PIII je respirace více než 3krát vyšší.

Přestože se u fibroblastů nemusí projevit žádné poruchy OXPHOS, lepší možností zkoumání poruch OXPHOS jsou vzorky ze svalové biopsie (viz 1.3.2), my jsme dokázali, že u pacientů trpících Huntingtonovou chorobou je patrný pokles respirace ve srovnání s respiračními kontrolami.

Studie byla pilotní. Byly proměřeny pouze tři linie pacientů a tři linie kontrol, proto jsme vzali k porovnání i výsledky měření linií kontrol z jiné studie (viz. 4.3). Pro přesnější porovnání by bylo potřeba proměřit více linií a také zopakovat měření vzorku vícekrát, případně měřit vzorky s různým počtem pasáží.

6 Závěr

Předložená práce popisuje jedno z vážnějších a smrtelných neurodegenerativních onemocnění Huntingtonovu nemoc. Popisuje její příčinu, kterou je znásobení tripletu CAG kódující glutamin a vznik mutovaného huntingtinu, příznaky, a to choreatické pohyby a poškození nervové tkáně, a dále popisuje způsoby diagnostiky.

Huntingtonova nemoc je způsobena mutovaným huntingtinem, který způsobuje vznik oxidačního stresu, poruchy biogeneze mitochondrií a poruchy OXPHOS. Na poruchy OXPHOS byla zaměřena naše práce, ve které jsme díky měření respirace pomocí přístroje Oxygraph-2k dokázali, že pacienti s diagnostikovanou Huntingtonovou chorobou vykazují pokles respirace, a tedy poruchy oxidační fosforylace, a to především poruchy komplexu II.

7 Citovaná literatura

1. **P. Siekvitz.** Powerhouse of the cell. *Scientific American*. vol.197. 1957, stránky 131–144.
2. **F. Duška.** Biochemie v souvislostech 1.díl. 1. vydání. Praha. Karolinum. 2006, stránky 165–185.
3. **A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox.** Principles of Biochemistry. 6. vydání. New York. W. H. Freeman and Company. 2013, stránky 521–532.
4. **A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, N. Pfanner.** Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*. 138. 2009, stránky 628–644.
5. **W. J. Craigen.** Mitochondrial DNA mutations: An overview of clinical and molecular aspects. *Methods Molecular Biology*. 837. 2012, stránky 3–15.
6. **R. Acin-Perez, P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos, J. A. Enriquez.** Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell*. 32. 2008, stránky 529–539.
7. **J. E. Walker.** The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly reviews of biophysics*. 25. 1992, stránky 253–324.
8. **T. Yagi, A. Matsuno-Yagi.** The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry*. 42. 2003, stránky 2266–2274.
9. **T. Ohnishi.** Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochimica et biophysica acta*. 1364. 1998, stránky 186–206.
10. **C. Hagerhall.** Succinate: quinone oxidoreductases. *Biochimica et biophysica acta*. 1320. 1997, stránky 107–141.
11. **R.S. Lemos, A.S. Fernandes, M.M. Pereira, C.M. Gomes, M. Teixeira.** Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. *Biochimica et biophysica acta*. 1553. 2002, stránky 158–170.
12. D. E. Robertson et al. , Biochemistry 32 , 1310 (1993);
13. **X. H. Yang, B. L. Trumpower.** *Biological Chemistry*. 261. 1986
14. **H. Schagger, T. A. Link, W. D. Engel, G. von Jagow.** *Methods in enzymology*. 126. 1986, 224
15. **M. Hartmut.** Respiratory Chain Complex IV. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 4. 1–4.

16. **R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell.** Harper's Illustrated Biochemistry. Medical Publishing Division. 26. vydání. 2003.
17. **S. Ferguson-Miller, C. Hiser, J. Liu.** Gating and regulation of the cytochrome c oxidase proton pump. *Biochimica et biophysica acta*. 1520. 2011.
18. **J. Koolman, K. H. Röhm.** Barevný atlas biochemie. Grada Publishing a.s.. 2012, 512 stránek.
19. https://cs.wikipedia.org/wiki/Huntingtonova_choroba (Citace 25.2.2017)
20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782548> (Citace 15.12.2016)
21. **C.A. Ross, E.H. Aylward, E.J. Wild, D.R. Langbehn, J.D. Long.** Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews. Neurology*. 2014, stránky 204–216.
22. **J. Thompson, M. W. Scott, R. L. Nussbaum.** Klinická genetika: Thompson & Thompson. Triton. 6. vydání. Praha, 2004, stránka 426.
23. **M. MacDonald.** The Huntington's Disease Collaborative Research Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 72. 1993, stránky 971–983.
24. **E. Cattaneo, Ch. Zuccato, M. Tartari, M.** Normal Huntingtin Function: An Alternative Approach To Huntington's Disease, *Neuroscience*. 6. 2005, stránky 919–930
25. **J. Jankovic.** Movement disorders: Bradley's Neurology in Clinical Practice. Elsevier Saunders. 6. vydání. Philadelphia. 2012, kapitola 71.
26. **S.C. Warby, R.K. Graham, M.R. Hayden.** GeneReviews: Huntingtonova chorea. Národní centrum pro biotechnologické informace.
27. **R.L.Margolis, R. Christopher.** Diagnóza Huntingtonovy choroby. *Klinické chemie*. 49. 2003; stránky 1726-1732.
28. **R.H. Myers.** Huntingtonova nemoc genetiky. *Žurnál americké společnosti pro experimentální NeuroTherapeutics*. 1. 2004, stránky 255-262.
29. **N.T.Potter, E.B. Spector, T.W. Prior.** Technické normy a pokyny pro Huntingtonovou chorobou. *American College lékařské genetiky*. 2006, stránky 214-252.
30. **S.C. Warby, R.K. Graham, M.R. Hayden.** GeneReviews: Huntingtonova chorea. Národní centrum pro biotechnologické informace.
31. **A.T. Hoogeveen.** Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Human Molecular Genetics*. 2. 1993, stránky 2069–2073.

32. **J.P. Caviston, E.L. Holzbaur.** Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends in cell biology*. 19. 2009, stránky 147–155.
33. **S.H. Li, X.J. Li.** Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in genetics*. 20. 2004, stránky 146–154.
34. **K.L. Sugars, D.C. Rubinsztein.** Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends in genetics*. 19. 2003, stránky 233–238.
35. **X.J. Li, S.H. Li.** HAP1 and intracellular trafficking. *Cell adhesion and migration*. 26. 2005, stránky 1–3.
36. **J.P. Caviston, J.L. Ross, S.M. Antony, M. Tokito, E.L. Holzbaur.** Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *The Journal of cell biology*. 104. 2007, stránky 10045–10050.
37. **P.W. Faber, G.T. Barnes, J. Srinidhi, J. Chen, J.F. Gusella, M.E. MacDonald.** Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Human Molecular Genetics*. 7. 1998, stránky 1463–1474.
38. **J.K. White.** Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature genetics*. 17. 1997, stránky 404–410.
39. **J. Nasir.** Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*. 81. 1995, stránky 811–823.
40. **P. Hilditch-Maguire, F. Trettel, L.A. Passani, A. Auerbach, F. Persichetti, M.E. MacDonald.** Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Human Molecular Genetics*. 9. 2000, stránky 2789–2797.
41. **J.D. Godin.** Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron*. 67. 2010, stránky 392–406.
42. **M.A. La Fontaine, J.W. Geddes, A. Banks, D.A. Butterfield.** 3-nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Research*. 858. 2000, stránky 356–362.
43. **P.R. Gardner, I. Raineri, L.B. Epstein, C.W. White.** Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 270. 1995, stránky 13399–13405.
44. **S.E. Browne, R.J. Ferrante, M.F. Beal.** Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain pathology*. 9. 1999, stránky 147–163.
45. **S.M. Hersch.** Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH²'dG. *Neurology*. 66. 2006, stránky 250–252.

46. **A. Santamaria.** Comparative analysis of superoxide dismutase activity between acute pharmacological models and a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochemical Research*. 26. 2001, stránky 419–424.
47. **A. Goswami.** Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochemical and biophysical research communications*. 342. 2006, stránky 184–190.
48. **D.G. Nicholls.** Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta*. 1787. 2009, stránky 1416–1424.
49. **T.E. Gunter, L. Buntinas, G. Sparagna, R. Eliseev, K. Gunter.** Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*. 28. 2000, stránky 285–296.
50. **A.V. Panov.** Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature neuroscience*. 5. 2002, stránky 731–736.
51. **I.S. Seong.** HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Human molecular genetics*. 14. 2005, stránky 2871–2880.
52. **Y.S. Choo, G.V. Johnson, M. MacDonald, P.J. Detloff, M. Lesort.** Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human molecular genetics*. 13. 2004, stránky 1407–1420.
53. **N. Brustovetsky.** Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 23. 2003, stránky 4858–4867.
54. **J. Lin, C. Handschin, B.M. Spiegelman.** Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism*. 1. 2005, stránky 361–370.
55. **R.C. Scarpulla.** Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of cellular biochemistry*. 97. 2006, stránky 673–683.
56. **R.K. Chaturvedi.** Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Human molecular genetics*. 18. 2009, stránky 3048–3065.
57. **L. Cui.** Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*. 127. 2006, stránky 59–69.
58. **M.A. Sorolla.** Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free radical biology & medicine*. 49. 2010, stránky 612–621.
59. **A.L. Orr.** N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 28. 2008, stránky 2783–2792.

60. **A. Siddiqui.** Mitochondrial DNA damage is associated with reduced mitochondrial bioenergetics in Huntington's disease. *Free radical biology & medicine*. 53. 2012, stránky 1478–1488.
61. **S.T. Grafton.** Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. *Arch Neurology*. 49. 1992, stránky 1161–1167.
62. **W.J. Koroshetz, B.G. Jenkins, B.R. Rosen, M.F. Beal.** Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Annals of neurology*. 41. 1997, stránky 160–165.
63. **S. Palfi.** Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience*. 16. 1996, stránky 3019–3025.
64. **S.E. Browne.** Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology*. 41. 1997, stránky 646–653.
65. **A. Solans, A. Zambrano, M. Rodriguez, A. Barrientos.** Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Human Molecular Genetics*. 15. 2006, stránky 3063–3081.
66. **P. Guidetti.** Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Experimental Neurology*. 169. 2001, stránky 340–350.
67. **T.M. Horton, B.H. Graham, M. Corral-Debrinski, J.M. Shoffner, A.E. Kaufman, M.F. Beal, D.C. Wallace.** Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. *Neurology*. 45. 1995, stránky 1879–83.
68. **B. Chazotte, G. Vanderkooi.** Multiple sites of inhibition of mitochondrial electron transport by local anesthetics. *Biochimica et biophysica acta*. 636. 1981, stránky 153–61.
69. **L. P. Van den Heuvel, J.A. Smeitink, R.J.T. Rodenburg.** Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. *Mitochondrion*. 4. 2004, stránky 395–401.
70. <http://www.agilent.com> (Citace 14.2.2017)
71. **P. Oesper.** The history of the Warburg apparatus: Some reminiscences on its use. *Journal Chem Education*. 41. 1964, stránka 294.
72. **B. Chance, G.R. Williams.** A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*. 175. 1955, stránky 1120–1.
73. **E. Gnaiger, H. Forstner.** Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. 12. 1983, stránky 410–410.

74. **S.J. Tabrizi, M.W. Cleeter, J. Xuereb, J.W. Taanman, J.M. Cooper, A.H. Schapira.** Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Annals of neurology*. 45. 1999, stránky 25–32.
75. **T. Haller, M. Ortner, E. Gnaiger.** A respirometer for investigating oxidative cell metabolism: toward optimization of respiratory studies. *Analytical biochemistry*. 218. 1994, stránky 338–42.
76. **D. Pesta, E. Gnaiger.** High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in molecular biology*. 810. 2012, stránky 25–58.
77. **A.V. Kuznetsov.** Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature protocols*, 3. 2008, stránky 965–976.
78. <http://wiki.orooboros.at> (Citace 15.2.2017)